

**Strukturelle und kinetische Charakterisierung der
Nicotinsäuremononukleotid-Adenylyltransferase
des Malariaparasiten *Plasmodium falciparum***

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

des Fachbereichs Biologie und Chemie, FB08
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Jochen Bathke

Dezember 2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Interdisziplinären Forschungszentrum der Justus-Liebig-Universität Gießen an der Professur für Biochemie und Molekularbiologie unter Leitung von Prof. Dr. Katja Becker angefertigt.

Referentin: Prof. Dr. Katja Becker

Korreferent: Prof. Dr. Peter Friedhoff

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Tina Trenczek

Prof. Dr. Lienhard Schmitz

*Wissenschaftler haben ein großes Talent dafür mit dem Kopf gegen die Wand zu rennen
und zwar so lange bis die Wand nachgibt.*

Autor unbekannt

*Almost all aspects of life are engineered at the molecular level,
and without understanding molecules we can only have a
sketchy understanding of life itself.*

Francis Crick, *What Mad Pursuit: A Personal View of Scientific Discovery*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Malaria.....	2
1.2 Die Malariaparasiten der Gattung <i>Plasmodium</i>	4
1.2.1 Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i>	5
1.2.2 Pathogenese einer Malariaerkrankung.....	7
1.3 Gegenwärtige Therapiestrategien.....	9
1.4 Oxidativer Stress und <i>Plasmodium</i>	10
1.5 Der Pentosephosphatweg und NAD(P).....	11
1.6 NAD(P) und seine Aufgaben.....	12
1.7 NAD(P)-Synthesewege und die daran beteiligten Proteine.....	13
1.7.1 NAD(P) und <i>Plasmodium</i>	15
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit.....	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Materialien.....	18
2.1.1 Chemikalien.....	18
2.1.2 Geräte.....	20
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.4 Komplettsysteme.....	24
2.1.5 Enzyme.....	24
2.1.6 Antikörper.....	25
2.1.7 Zellstämme.....	25
2.1.8 Vektoren.....	25
2.1.9 Oligonukleotide.....	26
2.1.10 Größenstandards.....	26
2.1.11 Kristallisations-screens.....	27
2.1.12 Verwendete Software.....	27
2.2 Mikrobiologische Methoden.....	28
2.2.1 Anzucht von <i>E. coli</i> Zellen in Nährmedien.....	29
2.2.1.1 Arbeiten mit <i>E. coli</i> Zellen.....	30
2.2.1.2 Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	31
2.2.2 Plasmidvektoren.....	32
2.2.3 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	33
2.2.3.1 Calciumchlorid basiertes Verfahren.....	33
2.2.3.2 Rubidiumchlorid basiertes Verfahren.....	34
2.2.4 Transformationen von <i>E. coli</i> Zellen.....	35
2.2.4.1 Calciumchloridpräzipitation.....	35
2.2.5 Glycerinkulturen von <i>E. coli</i> Zellen.....	36
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	36

2.3.1 Gelelektrophorese.....	36
2.3.1.1 Analytische Agarosegelelektrophorese	36
2.3.1.2 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.3.2 Isolation von Plasmid-DNA (Mini-/Midiprep).....	38
2.3.3 Polymerasekettenreaktion.....	38
2.3.3.1 Standard-PCR.....	38
2.3.3.2 <i>Colony-PCR-screen</i>	40
2.3.3.3 Gradienten-PCR.....	40
2.3.4 Molekulare Klonierung.....	40
2.3.4.1 Erstellen eines <i>insert</i> mittels PCR.....	41
2.3.4.2 Verdau von DNA-Molekülen durch Restriktionsendonukleasen.....	41
2.3.4.3 Ligation zweier DNA-Fragmente.....	41
2.3.4.4 <i>Screening</i> von Bakterienkolonien nach rekombinanten Plasmiden.....	42
2.3.4.5 Auswertung von DNA-Sequenzierungen.....	42
2.3.5 Mutagenese.....	43
2.3.6 Bestimmung von DNA-Konzentrationen.....	44
2.4 Genexpression und Reinigung von Proteinen aus <i>E. coli</i>	45
2.4.1 Expressionssysteme.....	45
2.4.1.1 T5-Expressionssystem.....	45
2.4.1.2 T7-Expressionssystem.....	45
2.4.2 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	46
2.4.3 Reinigung von Proteinen aus <i>E. coli</i>	47
2.4.4 Analytische SDS-PAGE.....	48
2.4.5 Western Blot.....	50
2.5 <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> zur Proteinreinigung.....	51
2.6 Charakterisierung von Proteinen.....	52
2.6.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	52
2.6.2 Kinetische Charakterisierung von Proteinen.....	53
2.6.2.1 Kolorimetrischer Phosphatnachweis.....	53
2.6.2.2 Kolorimetrischer Phosphatnachweis mittels Malachitgrün.....	54
2.6.2.3 NaMNAT Enzymassays für den Phosphatnachweis.....	54
2.6.2.4 Einstellung von Substratkonzentrationen.....	55
2.6.2.5 Datenauswertung nach Michaelis-Menten.....	56
2.7 Strukturbiologische Methoden.....	56
2.7.1 Proteinkristallisation.....	56
2.7.1.1 Proteinkristallisation mittels Dampfdiffusion.....	57
2.7.1.2 Proteinkristallisation mittels Gegendiffusion.....	58
2.7.1.3 <i>Seeding</i> Techniken zur Proteinkristallisation.....	59
2.7.1.4 <i>Additive screen</i>	59
2.7.1.5 Cokristallisation mit Substrat- oder Produktzusatz.....	60

2.7.2 Röntgenkristallographische Datenerfassung.....	61
2.7.3 Röntgenkristallographische Datenauswertung.....	61
3 Ergebnisse.....	63
3.1 NaPRT.....	63
3.1.1 Molekulare Klonierung von NaPRT.....	63
3.1.2 Expression und Optimierung der Reinigung von NaPRT.....	64
3.1.3 Kristallisationsversuche von NaPRT.....	66
3.1.4 Erster Versuch einer kinetischen Charakterisierung von NaPRT.....	67
3.2 PfNaMNAT.....	68
3.2.1 Expression und optimierte Reinigung von PfNaMNAT.....	68
3.2.2 Kristallisation von PfNaMNAT.....	70
3.2.2.1 Initiale Suche einer Kristallisationsbedingung.....	70
3.2.2.2 Optimierung einer ersten Kristallisationsbedingung.....	71
3.2.2.3 Kristallisationsversuche mittels <i>seeding</i> -Verfahren.....	73
3.2.2.4 Kristallisationsversuche mit Zusatz von MgSO ₄	73
3.2.2.5 Kristallisationsversuche mittels Substratanaloga und Produkten.....	74
3.2.2.6 Optimierung der Kristallisation der PfNaMNAT.....	75
3.2.2.7 Erster Lösungsversuch der Kristallstruktur.....	76
3.2.2.8 Generierung eines zweiten Proteinkristalls.....	78
3.2.2.9 Lösung der Kristallstruktur der PfNaMNAT und Evaluation der Modellqualität	79
3.2.3 Die Struktur der PfNamnat.....	85
3.2.3.1 Die Sekundärstruktur der PfNaMNAT.....	86
3.2.3.2 Supersekundärstrukturmotiv Rossmann-Falte.....	89
3.2.3.3 Strukturvergleich der NaMNATs verschiedener Organismen identifiziert wichtige Motive der PfNaMNAT.....	91
3.2.3.4 Die Substratbindetasche der PfNaMNAT.....	95
3.2.3.5 Vergleich der Substratbindetaschen verschiedener NaMNATs.....	101
3.2.3.6 Quartärstruktur der PfNaMNAT.....	104
3.2.4 Kinetische Charakterisierung von NaMNAT und seinen Mutanten.....	104
3.2.4.1 Ammoniummolybdat/Ascorbat basierte Kinetik.....	105
3.2.4.2 Malachitgrün basierte Kinetik.....	107
3.2.4.3 Aktivitätsvergleich der PfNaMNAT-Mutanten mit dem WT.....	111
3.2.4.4 Auswirkung von Oxidation auf die PfNaMNAT.....	112
3.2.5 Suche nach einem Inhibitor der PfNaMNAT.....	113
3.2.5.1 Wirksamkeitstest von Tiazofurin gegen <i>P. falciparum</i> 3D7 in Zellkultur.....	113
3.2.5.2 <i>Screening</i> der MMV Malaria Box.....	114
3.3 Kristallisation von Plasmoredoxin.....	115
3.3.1 Expression und Reinigung von Plrx.....	115
3.3.2 Analyse des Oligomerisierungsstatus und Optimierung der Reinigung.....	116

3.3.3 Kristallisation von Plrx.....	118
3.4 Kristallisation von PfGR.....	120
4 Diskussion.....	122
4.1 Zur Kristallisation von Proteinen und der PfNaMNAT im Besonderen.....	122
4.2 Der mutmaßliche Katalysemechanismus der PfNaMNAT.....	126
4.3 Die Grundlage der Substratpräferenz der PfNaMNAT.....	128
4.4 Durch die Substratbindung induzierte Konformationsänderung.....	133
4.5 Mögliche Regulation der PfNaMNAT.....	139
4.6 Die Bedeutung der Cysteine 41 und 43.....	141
4.7 Kinetischer Vergleich mit anderen NaMNATs.....	144
5 Ausblick.....	146
6 Zusammenfassung.....	147
7 Summary.....	148
8 Anhang.....	149

1 Einleitung

Infektionskrankheiten sind so alt wie die Menschheit selbst. Auch heute noch ist die Relevanz verschiedenster Infektionskrankheiten ungebrochen. Im Gegenteil rücken sie sogar vielfach in das Zentrum des öffentlichen Interesses und sorgen auch in den Medien für Schlagzeilen. Beispiele hierfür sind mannigfaltig, so sorgte die SARS-Pandemie von 2002/03 täglich für neue Meldungen. Schon nahezu vertraut erscheint die alljährliche Warnung vor einer neuen Grippewelle. Wobei es immer wieder aufs Neue Grippevarianten gibt, denen das Potential zur Pandemie zugesprochen wird, wie etwa die Vogelgrippe H5N1. Dabei herrschte im vergangenen Jahrhundert durchaus ein gewisser Optimismus, dass man mit Infektionskrankheiten zusehends besser umgehen könnte. Bedeutende Wissenschaftler wie Louis Pasteur und Robert Koch hatten bereits im 19ten Jahrhundert die Grundlagen zum Verständnis der Infektionskrankheiten und deren Bekämpfung gelegt. Zumindest in der westlichen Welt ging mit dem Erkenntnisgewinn eine Verbesserung der Hygieneverhältnisse einher. Ein Meilenstein der medizinischen Versorgung war die Entwicklung von Impfstoffen. Der englische Arzt Edward Jenner erprobte bereits 1796 die Nutzung von Kuhpocken als Impfstoff gegen Pocken. Ende des 19ten Jahrhunderts wurden weitere Impfstoffe entwickelt. Pasteur selbst prägte den Terminus Vakzinierung und fand Impfstoffe gegen Geflügelcholera, Anthrax sowie Tollwut [1]. Die Nutzung von Impfstoffen resultierte schließlich in einem besonderen Triumph. Am 8. Mai 1980 konnte die WHO die Ausrottung der Pocken verkünden. Nicht im Geringeren bedeutsam war die Entdeckung des Penicillins 1928 durch Alexander Fleming. Die anschließende Nutzung von Antibiotika ermöglichte die vollständige Therapie von vielen mikrobiellen Krankheiten mit einem bis *dato* lebensbedrohlichen Verlauf wie Syphilis und Tuberkulose. Das Insektizid DDT versprach sogar die Ausrottung von Malaria und wurde höchst erfolgreich auch in Europa eingesetzt [2]. So propagierte Russell bereits 1955 „*Man's Mastery of Malaria*“ [3]. Angefacht durch die in der Tat enormen Fortschritte im Umgang mit Infektionskrankheiten sprach der Epidemiologe Cockburn 1963 bereits von „*The Evolution and Eradication of Infectious Diseases*“ [4] und Hinman proklamierte 1966 die „*World Eradication of Infectious Diseases*“ [5] [6]. Doch spätestens mit dem Auftreten des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) in den 1980ern wurde klar, dass Infektionskrankheiten auch zukünftig die Menschheitsgeschichte begleiten würden. Als ein entscheidender Wendepunkt wird die 1992 erschienene Studie „*Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States*“ des *Institute of Medicine* angesehen [7][8]. So wurde allgemein klar, dass neu oder erneut auftretende Infektionskrankheiten (*emerging infectious diseases* – EID) auch in Zukunft ein sehr ernst zu nehmendes Problem darstellen werden. Ganz im Gegenteil ist die Brisanz der EIDs heute sogar noch höher anzusiedeln als im vergangenen Jahrhundert. Ein sehr prominentes Beispiel, welches

die Sachlage exzellent verdeutlicht, ist die bereits oben erwähnte SARS-Pandemie von 2002/3. Innerhalb weniger Monate erlangte das SARS-Coronavirus eine weltweite Verbreitung [9]. Durch eine zunehmend vernetzte und globalisierte Welt mit internationalem Reiseaufkommen wurde das Virus von Hong Kong aus in die ganze Welt verbreitet. Hinzu kommt, dass immer mehr Menschen auf engstem Raum zusammenleben und -arbeiten. Eine Metropole wie Hong Kong stellt somit eine ideale Brutstätte für eine Infektionskrankheit oder generell Seuche dar. SARS ist zudem ein Beispiel für das Aufkommen neuer Zoonosen. Höchstwahrscheinlich ist SARS in Tiermärkten von Wildtieren auf den Menschen übergetreten [10]. Dies verdeutlicht exemplarisch, dass die Umstände für das Auftreten und die Verbreitung von EIDs heute vorteilhafter denn je sind, mit engem Kontakt zwischen Menschen und Tieren, einer hohen Bevölkerungsdichte und hohem globalen Reiseaufkommen.

Aber nicht nur neue Krankheiten stellen ein Problem dar, sondern auch altbekannte gewinnen ihre Bedeutung wieder. Hierzu zählt auch Malaria, welche, wie oben beschrieben, Mitte des vergangenen Jahrhunderts schon als besiegt angesehen wurde [11]. Auch das EDEN-Projekt (*Emerging Diseases in a changing European eNvironment*) der Europäischen Kommission befasste sich mit EID [12]. Zu den hierbei untersuchten Infektionskrankheiten zählen Erkrankungen, welche übertragen werden durch Zecken sowie Nager, Leishmaniose, der West-Nil-Virus, Malaria und allgemein Krankheiten mit einem Ursprung in Afrika [13]. Gerade in Entwicklungs- und Schwellenländern stellen parasitäre Protozoen-Arten auch gegenwärtig ein ernstes Problem dar. Zu nennen wären hier *Leishmania spec.* als Erreger der Leishmaniose oder die auf *Trypanosoma cruzi* zurückzuführende Chagas-Krankheit, welche in weiten Teilen von Lateinamerika auftritt. Ebenfalls zu den durch parasitäre Protozoen verursachten Krankheiten zählt Malaria.

1.1 Malaria

Die Bedeutung von Malaria ist auch heute noch ungebrochen. So ist sie nicht nur *per se* die bedeutendste Tropenkrankheit, sondern auch die wichtigste nach Deutschland importierte Tropenkrankheit [14]. Eindrucksvoll belegt wird dies anhand einiger durch die WHO veröffentlichter Zahlen. In dem *World Malaria Report* von 2013 finden sich Schätzungen, nach denen in 2012 207 Millionen Malariafälle weltweit auftraten, welche 627.000 Todesopfer forderten [15]. Dies steht in klarem Kontrast zu der Euphorie der 1950iger Jahre bezüglich der Ausrottung von Malaria. Dennoch konnten auch beachtliche Erfolge in der Bekämpfung von Malaria erzielt werden. In der ersten Hälfte des 20sten Jahrhunderts war Malaria noch in 178 Ländern endemisch. Die Bekämpfung der Krankheit zwischen 1945 und 2011 führte dazu, dass Malaria in 79 Ländern eliminiert werden konnte [16].

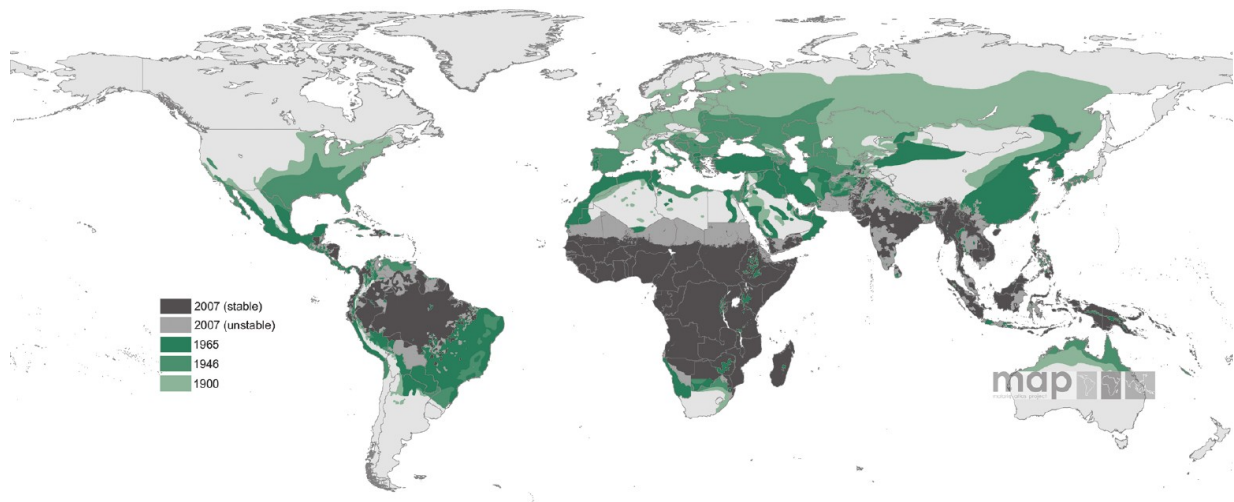


Abb. 1.1: Chronologie der globalen Malariaverbreitung zwischen 1900 und 2007.

Der Kampf gegen Malaria führte dazu, dass die Verbreitungsgebiete der Krankheit drastisch zurückgedrängt werden konnten. So wurde Malaria im Verlauf eines Jahrhunderts praktisch in der gesamten nördlichen Hemisphäre eliminiert. Heute findet man Malaria noch in tropischen Regionen rund um den Äquator. (Quelle der Abbildung [17]).

Welche enormen Fortschritte tatsächlich bereits erzielt wurden, wird besonders deutlich, wenn man sich eine Weltkarte ansieht, die aufzeigt, wo Malaria bereits zurückgedrängt werden konnte (siehe Abb. 1.1). Einstmals auch in der nördlichen Hemisphäre weit verbreitet, konnte Malaria bis heute in Europa, Nordamerika und weiten Teilen Asiens eliminiert werden. Verbliebene Endemiegebiete liegen in einem Gürtel rund um den Äquator, also in tropischen und subtropischen Regionen. Generell fällt auf, dass Malaria sowohl von Norden als auch von Süden her sukzessive beseitigt werden konnte. Heute tritt Malaria primär noch in Entwicklungs- und Schwellenländern auf. Ursächlich hierfür sind mehrere Faktoren. Allen voran gibt es ökonomische Gründe. Malariabekämpfungsprogramme sind sehr kostspielig und können nicht von allen Staaten nachhaltig finanziert werden. Erschwert werden derartige Programme, gerade auch in Afrika, durch eine Vielzahl von Kriegen und Bürgerkriegen während der vergangenen Jahrzehnte. Außerdem stellen die Tropen klimatisch ideale Verbreitungsgebiete der Überträgermücken dar. Eine Unterbrechung der Übertragungskette ist hier nur mit entsprechendem Aufwand zu erzielen.

Im Jahr 2013 wurde eine anhaltende Malariaübertragung noch in 97 Ländern beobachtet, sieben weitere Länder befanden sich in einer Phase der Vermeidung der Wiedereinführung von Malaria. Somit wird Malaria heute als endemisch in 104 Ländern betrachtet [15]. Gegenwärtige Schätzungen gehen davon aus, dass die halbe Weltbevölkerung nach wie vor davon bedroht ist, an Malaria zu erkranken [18]. Dabei ist Malaria vollständig vermeidbar sowie therapierbar [18]. Das größte Risiko einer Infektion tragen dabei Personen in Afrika südlich der Sahara [15]. Eine besondere Konzentration auf diese wirtschaftlich sowie infrastrukturell schwachen Länder ist

somit von Nöten. 1998 wurde die *Roll Back Malaria* (RBM) *Partnership* als Gemeinschaftsprojekt von WHO, UNICEF, UNDP sowie der Weltbank initiiert. Ihr Ziel ist eine koordinierte globale Anstrengung zur Bekämpfung von Malaria [19]. Im Rahmen dieser Initiative wurde der *Global Malaria Action Plan* erarbeitet. Langfristiges Ziel ist es dabei, die Krankheit vollständig zu bewältigen [20]. In ihrem *World Malaria Report* von 2013 gibt die WHO an, dass ca. 5,1 Milliarden USD jährlich nötig wären, um eine vollständige Malariaintervention zu erzielen [15]. Dem gegenüber stehen geschätzte Investition im Wert von ca. 2,5 Milliarden USD in 2012. Es ist somit abzusehen, dass trotz beachtlicher internationaler Anstrengungen Malaria auch noch in den kommenden Jahren eine enorme Rolle spielen wird.

Darüber hinaus könnte Malaria auch in Europa ihre Bedeutung wieder erlangen. Bedingt durch klimatische Veränderungen werden die Lebensbedingungen für die die Krankheit übertragenden Moskitos günstiger werden. Für die Camargue im Südosten Frankreichs wurde gezeigt, dass *Anopheles*-Spezies auftreten, welche potente Vektoren für verschiedene Malariaparasiten darstellen [21]. Innerhalb dieser Region sind die nötigen Prämissen für einen Malaria-Herd gegeben, mit entsprechenden Anophelen, ihren Habitaten und humanen Wirten. Es mangelt nur an den jeweiligen Parasiten. Gegenwärtige Untersuchungen gehen jedoch davon aus, dass das Risiko eines Wiederauftretens von Malaria noch als gering einzustufen ist [21][22]. Trotzdem konnten bereits Fälle einer möglichen autochthonen Übertragung der Krankheit in Frankreich [23] sowie Spanien [24] nachgewiesen werden. Das Potential zu einem Wiederaufleben der Krankheit ist somit auch in Europa gegeben. Eine globale Bekämpfung von Malaria ist somit auch eine präventive Maßnahme, um die Rückkehr von Malaria zu vermeiden.

1.2 Die Malariaparasiten der Gattung *Plasmodium*

Malaria ist eine Parasitose verursacht durch Protozoen der Gattung *Plasmodium*¹. Als Vektoren fungieren Dipteren des Genus *Anopheles*, mit mehreren hundert verschiedenen Spezies. Schätzungsweise 70 Arten der Anophelen sind in der Lage, humanpathogene Malariaparasiten zu übertragen [26]. Malaria findet sich jedoch nicht nur beim Menschen, sondern auch eine Vielzahl verschiedener Tiere kann daran erkranken. Verschiedene Plasmodienspezies verursachen Malaria bei Vögeln (z.B. *P. gallinaceum*), Reptilien (z.B. *P. mexicanum*), Nagern (z.B. *P. yoelii* und *P. berghei*) und einigen Affenarten, darunter Schimpansen (*P. reichenowi*). In der klassischen Literatur werden vier Arten von Plasmodien als humanpathogen aufgelistet, es sind dies *P. malariae*, *P. vivax*, *P. falciparum* sowie *P. ovale* [27]. *P. knowlesi* konnte in jüngerer Zeit der Liste der humanpathogenen Plasmodien hinzugefügt werden [28][29][30]. Der übliche Wirt von

¹ Im Tierreich finden sich neben dem wichtigsten Malariaerreger *Plasmodium spp.* noch weitere parasitäre Protozoen, welche Malaria als Erkrankung verursachen können. Hierzu zählen *Leucozytozoon*-, *Haemoproteus*-, *Hepatozoon*- sowie *Hepatozoon*-Arten [25].

P. knowlesi ist *Macaca fascicularis*, der Langschwanzmakake. Gerade in Südostasien wird die Relevanz von *P. knowlesi* auch für den Menschen zusehends deutlich. Früher häufig fehlinterpretiert als eine Infektion mit *P. malariae* wurde die Bedeutung von *P. knowlesi* lange Zeit unterschätzt [30].

Die Gattung *Plasmodium* zählt zu dem Stamm der Apicomplexa, teilweise auch als Sporozoa bezeichnet. Dieser Stamm umfasst eine Reihe parasitärer Protozoen, hierzu zählen auch *Toxoplasma*, *Gregarina*, *Babesia*, *Sacrocystis* und einige weitere Gattungen. Das gemeinsame Merkmal der Apicomplexa ist eine komplexe Struktur am apicalen Zellpol, dem Apex. Diese apicale Struktur, der sog. Apikalkomplex, war namensgebend für den Stamm, sie ist jedoch nur elektronenmikroskopisch zu erkennen [31][27]. Als obligate intrazelluläre Parasiten sind Plasmodien und andere Apicomplexa darauf angewiesen in Wirtszellen einzudringen. Dieser intrazelluläre Parasitismus ist eine Spezialform des Endoparasitismus. Im Lebenszyklus von *Plasmodium* innerhalb des Menschen werden die Parasiten von verschiedenen Zelltypen beherbergt, es sind dies Kupffer-Zellen, Hepatocyten und Erythrocyten. Im Inneren der Moskitos müssen deren Darmepithel sowie die Zellen der Speicheldrüse durchdrungen werden. An eben diesen Invasionprozessen sind die Organellen im Apikalkomplex der Parasiten beteiligt [32].

1.2.1 Lebenszyklus von *Plasmodium*

Plasmodium, aber auch Apicomplexa im Allgemeinen, weisen einen deutlich komplexeren Lebenszyklus auf, als er bei anderen freilebenden Protozoen üblich ist. Dabei ist ein Generationswechsel zu verzeichnen. Dies ist der Wechsel zwischen geschlechtlicher und ungeschlechtlicher Fortpflanzung. Die ungeschlechtliche Reproduktionsphase bezeichnet man als Agamogonie. Die geschlechtliche Reproduktionsphase, verbunden mit der Bildung von haploiden Gameten wird als Gamogonie klassifiziert. Weitere Zellindividuen von *Plasmodium* entstehen mittels multipler Teilungen. Aus einem Ausgangsindividuum entstehen in diesem Fall direkt mehrere Nachkommen. Hierüber kann der schnelle Befall eines neuen Wirtes sowie die effiziente Verbreitung innerhalb des Wirtes sichergestellt werden.

Im Lebenszyklus der Parasiten kann man drei Phasen unterscheiden, es sind dies Sporogonie, Schizogonie und Gamogonie. Sporogonie sowie Schizogonie dienen beide ungeschlechtlicher Fortpflanzung, wobei Sporogonie Stadien hervorbringt, welche auf einen neuen Wirt übertragen werden und Schizogonie zur Vermehrung innerhalb eines Wirtes führt. Die geschlechtliche Reproduktion erfolgt in der Gamogonie. Ausgangspunkt hierbei sind Gamonten, also jene Zellen, die letztendlich die eigentlichen Gameten hervorbringen. Da sich diese Geschlechtszellen bei *Plasmodium* in ihrem Habitus unterscheiden, handelt es sich um Anisogameten.

Plasmodium parasitiert zwei verschiedene Wirte. Zum einen ist dies der Mensch (oder ein

anderes Tier) als Zwischenwirt und ein Moskito der Gattung *Anopheles* als Endwirt. Dabei bezeichnet man nur denjenigen Wirt als Endwirt, in dem die geschlechtliche Fortpflanzung abgeschlossen wird. Im Menschen erfolgt somit nur eine ungeschlechtliche Reproduktion. Dies wird deutlich, wenn man sich den Lebenszyklus im Detail ansieht. Als Startpunkt für die weitere Beschreibung soll hier der Stich von *Anopheles* angesehen werden. Die Stechmücke agiert hierbei als Ektoparasit. Sie nimmt während des Saugaktes nicht nur Blut für ihre Eiproduktion zu sich, sondern gibt auch ihren Speichel in die Einstichstelle ab. Neben gerinnungshemmenden Stoffen überträgt eine infizierte Mücke hierbei auch Plasmodien auf das Opfer. Die übertragenen Stadien des Parasiten werden als Sporozoiten bezeichnet. Diese Sporozoiten gelangen mit dem Blutstrom in die Leber, wo sie in Hepatocyten eindringen. In diesem Organ durchlaufen sie eine präerythrocytäre Schizogonie, die in Merozoitenbildung resultiert. Davon abgesehen können einige Plasmodienspezies in der Leber auch sog. Hypnozoiten bilden, dies sind dormante Dauerstadien. Im weiteren Verlauf der Infektion gelangen die Merozoiten erneut in den Blutstrom. Dort befallen diese dann Erythrocyten und dringen in sie ein. Die weitere Vermehrung erfolgt dann in den Erythrocyten, in der erythrocytären Schizogonie. Bei der Vermehrung in den Erythrocyten kann man verschiedene Zellstadien anhand ihres Habitus unterscheiden, es sind dies in chronologischer Abfolge Ringstadium, Trophozoiten und Schizonten. Schizonten sind die Teilungsformen der Trophozoiten, welche letztlich wieder neue Merozoiten hervorbringen. Mit der Lyse des parasitierten Erythrocyten werden die Merozoiten freigesetzt, die erneut Erythrocyten infizieren können. Der nächste Schritt im Lebenszyklus von *Plasmodium* ist erreicht, wenn aus den Merozoiten Gamonten hervorgehen. Dieser Start der geschlechtlichen Reproduktion erfolgt noch in den Erythrocyten innerhalb des Menschen, wird jedoch erst im Moskito abgeschlossen. Diese Vorstufen der Geschlechtsformen kann man unterscheiden in weibliche Makrogamonten und männliche Mikrogamonten. Erst nach dem Saugakt eines Moskitos entwickeln sich diese Formen weiter in Makrogameten und Mikrogameten. Die Geschlechtszellen verschmelzen schließlich paarweise zu einer Zygote aus der ein motiler Ookinet hervorgeht. Diese Ookineten sind dazu in der Lage, das Darmepithel des Moskitos zu penetrieren und wachsen an der Darmaußenwand zu Oocysten heran. In den Oocysten entstehen tausende von Sporozoiten, die nach dem Platzen der Oocyste in die innere Leibeshöhle der Mücke entweichen. Dort schwimmen die motilen Sporozoiten zu den Speicheldrüsen, welche sie penetrieren und sich letztlich in den Drüsenkanälen sammeln. Hiermit ist ein Entwicklungszyklus abgeschlossen und kann mit der Infektion eines weiteren Zwischenwirtes von neuem beginnen [27][33][31].

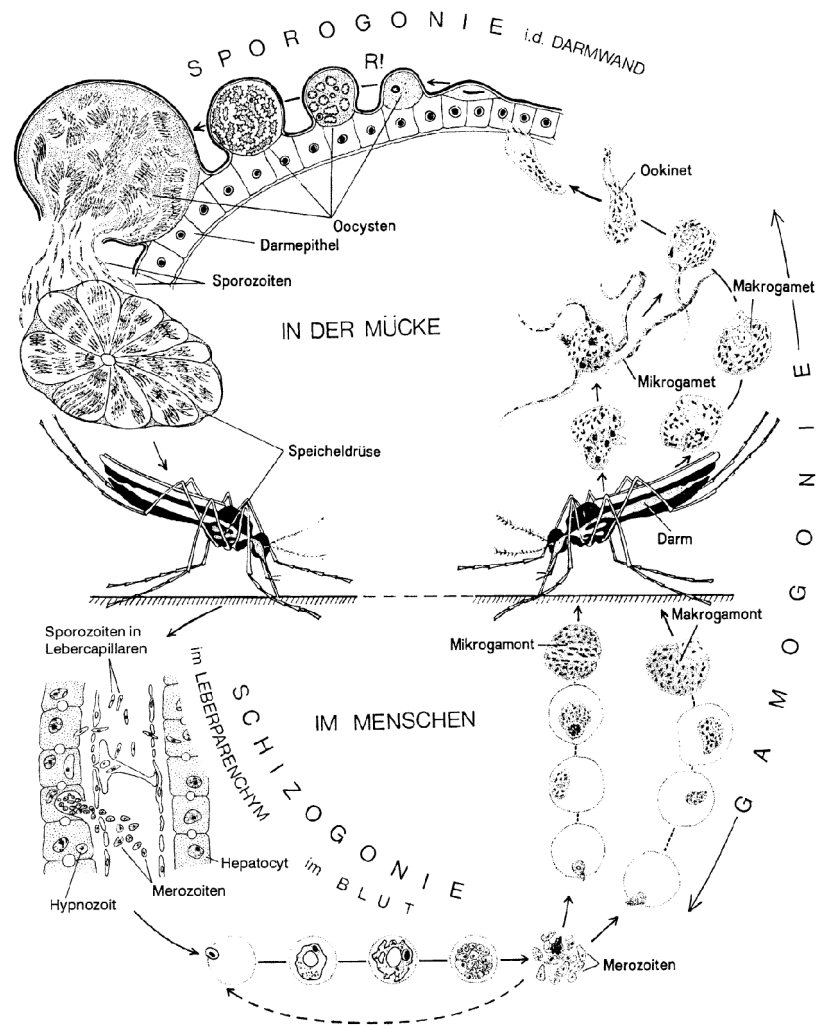


Abb. 1.2: Entwicklungszyklus von *Plasmodium vivax*.

Plasmodien weisen einen dreiphasigen Generationswechsel auf. Hierbei alternieren mehrere asexuelle Generationen (Sporogonie und Schizogonie) mit einer sich sexuell reproduzierenden Generation (Gamogonie). Der Generationswechsel geht dabei mit einem Wirtswechsel einher. Der Stich eines Moskitos überträgt den Parasiten auf den Menschen. In Hepatocyten und darauf Erythrocyten findet die Schizogonie statt. Es schließt sich die Gamogonie an, die im Menschen beginnt, jedoch erst in den Stechmücken einen Abschluss findet. Im Darmepithel der *Anopheles*-Mücken erfolgt schließlich die Sporogonie. (Quelle der Abbildung: [27], Kükenenthal Seite 33, © Springer-Verlag, mit freundlicher Genehmigung von Springer Science+Business Media.)

1.2.2 Pathogenese einer Malariaerkrankung

Der eigentlich „harmlose“ Stich eines Moskitos ist der Ausgangspunkt einer Malariaerkrankung. Die Mücke fungiert hierbei als Vektor für die Übertragung der parasitären Einzeller. Neben diesem üblichen Übertragungsweg ist ganz allgemein der Kontakt mit infiziertem Blut ein möglicher Ausgangspunkt einer Malariainfektion. Hierzu zählt auch die Wiederverwendung von

Injektionsnadeln bei Drogenabhängigen. Bei der kongenitalen oder neonatalen Malaria können Parasiten kurz vor oder während der Geburt auf den Neonaten übertragen werden. Bislang wurde davon ausgegangen, dass kongenitale Malaria nur eine untergeordnete Rolle spielt. Diese Ansicht scheint sich jedoch zusehends zu wandeln. Es ist davon auszugehen, dass eine Fehldiagnose, etwa mit einer Sepsis, hier häufig auftritt [34][35].

Fünf für den Menschen pathogene Plasmodienspezies sind bekannt. Anhand von morphologischen Unterschieden in den Blutstadien sowie abweichenden klinischen Symptomen kann man eine Malariaerkrankung in drei Typen klassifizieren, es sind dies:

- *Malaria tertiana*, hervorgerufen durch *P. vivax*, *P. ovale* und *P. knowlesi*,
- *Malaria quartana*, hervorgerufen durch *P. malariae* sowie
- *Malaria tropica*, hervorgerufen durch *P. falciparum* [33].

Diese Subtypen der Malaria weisen verschieden lange Inkubationszeiten auf. Die Inkubationszeit der *Malaria tropica* liegt durchschnittlich bei 12 Tagen, kann jedoch zwischen 7 und 28 Tagen variieren. Bei der *Malaria tertiana* liegen meist 12 bis 18 Tage zwischen der Infektion und dem Auftreten erster Symptome. Die längste Inkubationszeit weist die *Malaria quartana* mit drei bis sieben Wochen auf. Davon abgesehen ist auch ein latenter Verlauf der Infektion möglich, so dass die Krankheit erst Monate nach einer Infektion zum Ausbruch kommt. Außerdem kann die Bildung von dormanten Hynozooten in der Leber (nur bei *P. ovale* und *P. vivax*) auch nach Jahren noch Rezidive verursachen [14].

Der grundlegende Krankheitsverlauf ist bei allen Formen der Malaria identisch. Die durch den Saugakt einer *Anopheles*-Mücke übertragenen Sporozoiten befallen zuerst Hepatocyten. Dort bilden sie durch multiple Teilung Merozoiten, welche in den Blutkreislauf entlassen werden. Hier werden schließlich Erythrocyten infiltriert. In den Erythrocyten erfolgt eine starke Vermehrung der Parasiten. Hierbei können je nach Art 8 bis 32 neue Merozoiten entstehen. Am Ende dieses Vermehrungsprozesses steht das Aufplatzen des Erythrocyten, wodurch die Merozoiten freigesetzt werden. Mit der Lyse der Erythrocyten gehen auch die auffälligsten Symptome der Malaria einher, die typischen Fieberanfälle. Dieser Leitsymptomatik hat Malaria auch den umgangssprachlichen Namen Sumpffieber zu verdanken. Taktgebende Einflüsse des Wirtsorganismus führen letztlich zur synchronisierten Freisetzung von Merozoiten. Bis es zu einer derartigen synchronisierten Entwicklung der Schizonten in den Erythrocyten kommt, können jedoch einige Tage vergehen. Zuvor treten die Fieberschübe unregelmäßig auf. Bei der *Malaria tertiana* treten die Fieberschübe alle 48 h auf. Dieser Zyklus ist bei *Malaria quartana* etwas länger, mit Fieberschüben dann alle 72 h. Dem kann eine Phase kurzfristigen Schüttelfrosts vorausgehen. Bei *Malaria tropica* hingegen tritt das Fieber unregelmäßig auf. Bei multiplen Infektionen mit Krankheitserregern der *Malaria tertiana* können Fieberschübe auch

alle 24 h auftreten. Liegen bei der *Malaria quartana* mehrere Parasitenpopulationen in einem Wirt vor, können sich diese Zyklen auf 48 oder 24 h verkürzen. Die unbehandelte Erkrankung mit Fieberanfällen kann je nach Typ der Malaria für zwei bis zu mehreren Wochen andauern. Danach klingen die Symptome ab. Der Parasitenbestand hingegen kann für viel längere Zeiträume fortbestehen. Für *P. falciparum* sind dies 6 – 8 Monate, bei anderen Plasmodienspezies ziehen sich diese Zeiträume über Jahre, bis hin zu über 30 Jahren bei *P. malariae*. Hierbei kann es zu einem chronischen Krankheitsverlauf kommen, der sich kontinuierlich verschlechtert [33].

Der kritischste Krankheitsverlauf ist bei der *Malaria tropica* zu beobachten, er kann sogar lebensbedrohlich werden. Kausal hierfür sind Besonderheiten der durch *P. falciparum* parasitierten Erythrocyten. Im elektronenmikroskopischen Bild der Erythrocyten kann man eine „pockennartige“ Oberflächenstruktur erkennen. Sog. *knobs* bilden hier leichte Ausstülpungen der Zellmembran. Diese Strukturen tragen dazu bei, dass die befallenen Erythrocyten an den Wänden feiner Kapillaren festhaften. Die Folgen hiervon sind Stase, Azidose, perivaskuläre Ödeme und petechiale Blutungen. Hierbei kommt es schließlich zu Organläsionen. Ist das Gehirn davon betroffen, spricht man von zerebraler Malaria, welches die häufigste Todesursache der *Malaria tropica* ist. Ebenfalls von den Organläsionen können die Nieren, die Lungen, das Herz und der Magen-Darm-Trakt betroffen sein [33].

Malaria kann leicht mit einer gewöhnlichen Grippe verwechselt werden, da beiden Erkrankungen Kopf- und Gliederschmerzen sowie eine erniedrigte Zahl von Leukocyten zu eigen sind [33].

1.3 Gegenwärtige Therapiestrategien

Gegenwärtig kann Malaria vollständig verhindert sowie therapiert werden [15]. Ein großer Fokus liegt dabei auf der prinzipiellen Prävention einer Erkrankung, durch die Vektorkontrolle [15]. Für Reisen in Malariaendemiegebiete besteht die Möglichkeit einer Chemoprophylaxe. Entsprechende Empfehlungen werden von dem CDC sowie der DTG erteilt [36][37][38].

Die bis heute gebräuchlichen Medikamente zur Prophylaxe sowie Therapie von Malaria kann man grob in wenige Substanzklassen einordnen. Dabei kennt man die folgenden chemischen Familien: 4-Aminochinoline, Arylaminoalkohole, 8-Aminochinoline und Sesquiterpenlactone (oder Artemisinine). Eine heterogene Gruppe von Wirkstoffen sind die Antifolate, Hemmstoffe der Atmungskette und Antibiotika [39][40]. Den gegenwärtigen Goldstandard zur Behandlung von Malaria stellen Artemisinin basierte Kombinationspräparate dar (ACTs, engl. *artemisinin-based combination therapies*) [41]. Die WHO empfiehlt sie etwa zur Bekämpfung von *P. falciparum* Malaria oder *P. vivax* Malaria, in denjenigen Gebieten, in welchen *P. vivax* eine

Chloroquinresistenz entwickelt hat. Es treten jedoch zusehends Resistenzen der Parasiten gegenüber den gegenwärtigen Wirkstoffen auf. In der erweiterten Mekong-Subregion (*Greater Mekong Subregion*) ist hiervon auch Artemisinin betroffen [15]. Um auch in Zukunft eine hinreichende Medikation von Malaria gewährleisten zu können, besteht ein kontinuierlicher Bedarf neuer Wirkstoffziele. Das antioxidative System von *Plasmodium* stellt sich als potentieller Kandidat dar.

1.4 Oxidativer Stress und *Plasmodium*

Zellen sind permanent oxidativem Stress ausgesetzt. Innerhalb der Atmungskette wird O_2 zu zwei Molekülen H_2O reduziert. Diese Reaktion wird durch die Cytochrom-C-Oxidase katalysiert [42]. In seltenen Fällen verläuft dieser Prozess jedoch unvollständig und es werden partiell reduzierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt [43]. Diese reagieren bereitwillig mit einer Vielzahl zellulärer Komponenten, darunter Proteine, Zellmembranen und Nukleinsäuren [44][45][46]. Um solche Schäden zu verhindern, sind Zellen mit einer Armada antioxidativer Effektoren ausgestattet, darunter Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase in Verbindung mit Glutathion (GSH) [43]. Nichtsdestotrotz ist oxidativer Stress auch in verschiedenen pathologischen Prozessen relevant, darunter finden sich neurodegenerative Erkrankungen wie Parkinson oder Alzheimer oder auch Krebs [47][48]. Oxidativer Stress kann jedoch auch von positivem Nutzen sein. So verwenden Neutrophile unter anderen Mechanismen auch von der NADPH-Oxidase produzierte ROS, um Mikroben abzutöten [49].

Auch im Zusammenhang mit Malaria ist oxidativer Stress von hoher Relevanz. Eine Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Defizienz (G6PDH), die weltweit häufigste Enzymopathie, geht mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Malaria einher [50]. Dies ist von besonderem Interesse, wenn man berücksichtigt, dass die G6PDH für die Produktion von NADPH relevant ist. Die primäre Aufgabe von NADPH in Erythrocyten besteht schließlich in der Reduktion von GSSG (oxidierte Form des Glutathions) zu GSH [42]. Ein G6PDH-Mangel wirkt sich somit auf das Redoxgleichgewicht in Erythrocyten, und somit auf die direkte Umgebung der intrazellulären Stadien von *Plasmodium*, aus. Die Entgiftung von ROS ist eine Herausforderung für Erythrocyten, die mit *Plasmodium* infiziert sind. Ausgehend von dem Metabolismus der Parasiten werden größere Mengen redox-reaktiver Nebenprodukte erzeugt. Die Degradierung von Hämoglobin durch *Plasmodium* führt zur Produktion von freiem Haem und ROS. In Folge dessen sind die Parasiten direkt oxidativem Stress ausgesetzt. Um trotzdem das nötige Redoxgleichgewicht aufrechtzuerhalten, weist *Plasmodium* ein effektives antioxidatives Abwehrsystem auf. Hierzu zählen in erster Linie GSH aber auch kleine, antioxidative Proteine wie Thioredoxin, Glutaredoxin, Peroxiredoxin sowie Plasmoredoxin [51]. Wie dieses

antioxidative Abwehrsystem genau aufgebaut ist, kann Abb. 1.3 entnommen werden. Letztlich wird die Last des oxidativen Stresses dabei durch ein komplexes Netzwerk antioxidativer Effektoren auf NADPH übertragen. Die Redoxäquivalente, welche somit letztlich den oxidativen Stress abfangen, werden dabei sowohl durch den Pentosephosphatweg des Parasiten sowie des Erythrocyten bereitgestellt. Somit erklärt sich auch, warum ein G6PDH-Mangel eine gewisse protektive Wirkung gegen Malaria entfaltet. Die oxidative Last des Parasiten wird durch diese Enzymopathie erhöht. Becker *et al.* beschreiben, dass die Erhöhung des oxidativen Stresses eines der vielversprechensten Prinzipien für eine Antimalariachemotherapie darstellt [51].

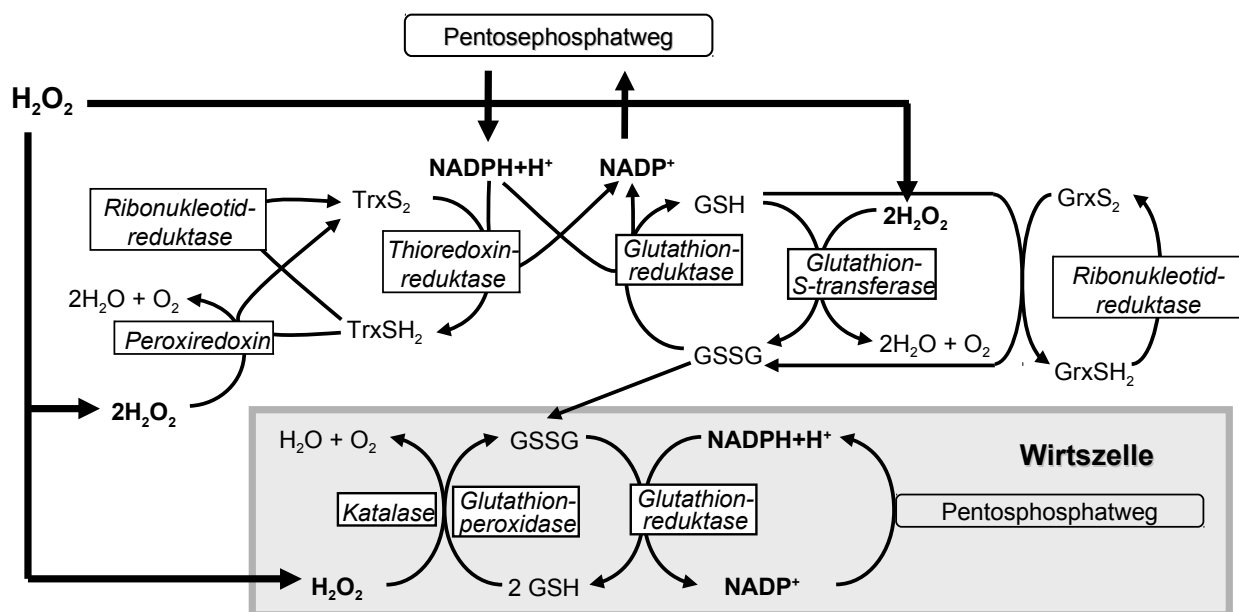


Abb. 1.3: Das antioxidative Abwehrsystem des Malaria Parasiten *Plasmodium*.

Plasmodium ist aufgrund seines Metabolismus innerhalb des Erythrocyten permanent oxidativem Stress ausgesetzt. Um dieser Herausforderung gerecht zu werden, weisen die Parasiten ein höchst ausgeklügeltes, antioxidatives Schutzsystem auf. Hierbei werden die Elektronen letztendlich auf NADPH übertragen. Die nötigen Reduktionsäquivalente werden dabei sowohl von dem Pentosephosphatweg des Parasiten sowie des Erythrocyten bereitgestellt. Das Schema wurde nach Becker *et al.* modifiziert [51].

1.5 Der Pentosephosphatweg und NAD(P)

Da der Pentosephosphatweg in finaler Konsequenz die Reduktionsäquivalente bereitstellt, welche *Plasmodium* benötigt, um oxidativen Stress bewältigen zu können, soll dieser physiologisch höchst wichtige Stoffwechselweg hier noch einmal kurz beschrieben werden.

Der Pentosephosphatweg ist für sämtliche Organismen von essentieller Bedeutung. Namensgebend für diesen Stoffwechselweg ist dabei eines seiner Endprodukte, es ist dies

Ribose-5-phosphat, ein Zucker mit fünf Kohlenstoffatomen. Dieser Zucker lässt sich wiederfinden als struktureller Bestandteil sämtlicher Nukleotide, also von DNA und RNA und darüber hinaus von ATP, NAD, NADP, FAD sowie Coenzym A. Im Weiteren deckt der Pentosephosphatweg den NADPH-Bedarf zu einem Großteil ab. Man kann den Pentosephosphatweg in zwei Phasen untergliedern. In einer ersten oxidativen Phase wird unter das Ausgangssubstrat Glucose-6-phosphat sukzessive oxidiert. Während dieses Prozesses werden auch Ribose-5-phosphat und NADPH synthetisiert. In einer zweiten nichtoxidativen Phase kann Ribose-5-phosphat in Zwischenprodukte der Glykolyse überführt werden. Dies ist nötig, da verschiedenste Zellen einen weit höheren Bedarf an Reduktionsäquivalenten für reduktive Biosynthesen aufweisen als an Nukleotiden. Durch Transketolase und Transaldolase ist schließlich eine reversible Verbindung zwischen Glykolyse und Pentosephosphatweg gegeben. Katalysiert wird der erste Schritt des Pentosephosphatwegs durch die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase [42].

1.6 NAD(P) und seine Aufgaben

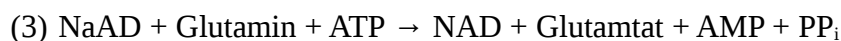
Den beiden Pyridinnukleotiden NAD und NADP kommt eine Schlüsselposition innerhalb des Energiemetabolismus zu. Beide fungieren dabei als Cofaktoren in einer Vielzahl von Redoxreaktionen [52]. So wie ATP ein *carrier* aktivierter Phosphorylgruppen ist, so sind NADH und NADPH *carrier* für aktivierte Elektronen, die ein hohes Energiepotential aufweisen. Diese Elektronen hoher Energie werden dabei von beiden Molekülen in Form eines Hydridions aufgenommen. Doch warum gibt es zwei Moleküle, denen effektiv eine identische Aufgabe zu kommt und, die sich zudem nur in einer Phosphorylgruppe unterscheiden? Die Phosphorylgruppe dient quasi als Marker, um zwischen Elektronen für den Anabolismus und Katabolismus unterscheiden zu können. NADH dient dabei als aktiviertes *carrier*-Molekül für Elektronen, die aus der Oxidation von Brennstoffmolekülen stammt. Letztendlich dient NADH also zur Erzeugung von ATP, wobei es in der Atmungskette oxidiert wird und das Hydridion somit wieder abgibt. NADPH dagegen ist ein Transportmittel von Elektronen, welche nahezu ausschließlich für reduktive Biosynthesen bestimmt sind. In Pflanzen kann NADPH direkt innerhalb der Photosynthese durch die Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase gewonnen werden. Davon abgesehen stellt der Pentosephosphatweg die Quelle des meisten NADPH dar, welches in reduktiven Biosynthesen Verwendung findet [42]. Interessant ist auch das Zusammenspiel von NADPH und GSH, welches bereits bei der Darstellung des Oxidationsstresses von *Plasmodium* angesprochen wurde. Wie man in Abb. 1.3 erkennt, ist NADPH nämlich dazu in der Lage, sein Reduktionspotential auf GSH zu übertragen.

Die absolut essentielle Rolle von NAD(P) innerhalb des Energiemetabolismus ist somit

offenkundig. Neueste Erkenntnisse belegen jedoch, dass NAD(P) auch die Funktion eines Signalmoleküls innewohnt. Bei der Mono- sowie Poly-ADP-Ribosylierung wird eine oder mehrere ADP-Riboseeinheiten auf ein Protein übertragen. Als Donor dieser Gruppe dient NAD, wobei Nicotinamid abgespalten wird. Diese posttranslationale Proteinmodifikation ist dabei in so fundamentale, zelluläre Prozesse wie Apoptose, Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur und Transkription involviert. NAD(P) kann im Weiteren auch in zyklische ADP-Ribose umgewandelt werden, ein Molekül, welches die Calciumfreisetzung beeinflusst. Dies sind nur zwei von mehreren Beispielen, bei denen NAD(P) an Signaltransduktionen beteiligt ist [52].

1.7 NAD(P)-Synthesewege und die daran beteiligten Proteine

Die Nutzung von NAD(P) stellt sich also als ein zyklischer Prozess dar, in dem NAD(P) erst durch die Addition eines Hydridions reduziert wird, somit selbst als Reduktionsäquivalent fungieren kann und in einer Redoxreaktion durch Übertragung seiner beiden aktivierten Elektronen auf ein anderes Molekül wiederum oxidiert wird. Hierbei wird das *carrier*-Molekül NAD natürlich nicht verbraucht. Nichtsdestotrotz ist eine kontinuierliche Biosynthese von NAD unabdingbar. Bei Zellteilung und Zellwachstum darf es zu keiner Verknappung von NAD kommen. Bei den angesprochenen Signalprozessen wird NAD selbst konsumiert und muss wieder ersetzt werden. Ausgehend von diesem kontinuierlichen Verbrauch des NAD ist der Bedarf einer steten Biosynthese des Moleküls offenkundig. 1958 deckten Preiss und Handler den klassischen nach ihnen benannten Stoffwechselweg zur NAD-Synthese auf [53][54]. Der Preiss-Handler-Weg besteht aus einer Triade der nachfolgend beschriebenen Reaktionen:



Im ersten Schritt wird Nicotinsäure mit Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) durch die Nicotinsäure-Phosphoribosyltransferase (NaPRT) in Nicotinsäuremononukleotid (NaMN) und Pyrophosphat (PP_i) umgewandelt. Aus den beiden Mononukleotiden NaMN und ATP kann darauf Nicotinsäureadenindinukleotid (NaAD) hergestellt werden, wobei ebenfalls PP_i freigesetzt wird. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Nicotinsäuremononukleotid-Adenylyltransferase. Im letzten Schritt wird NaAD unter Verbrauch von Glutamin und ATP zu dem Endprodukt NAD (ehemals auch als Diphosphopyridinnukleotid, kurz DPN bezeichnet) umgesetzt, wobei als Nebenprodukte auch AMP und wiederum PP_i entstehen. Bei diesem Schritt ist die NAD-Synthetase (NADS), oftmals fälschlich als NAD-Synthase bezeichnet, beteiligt.

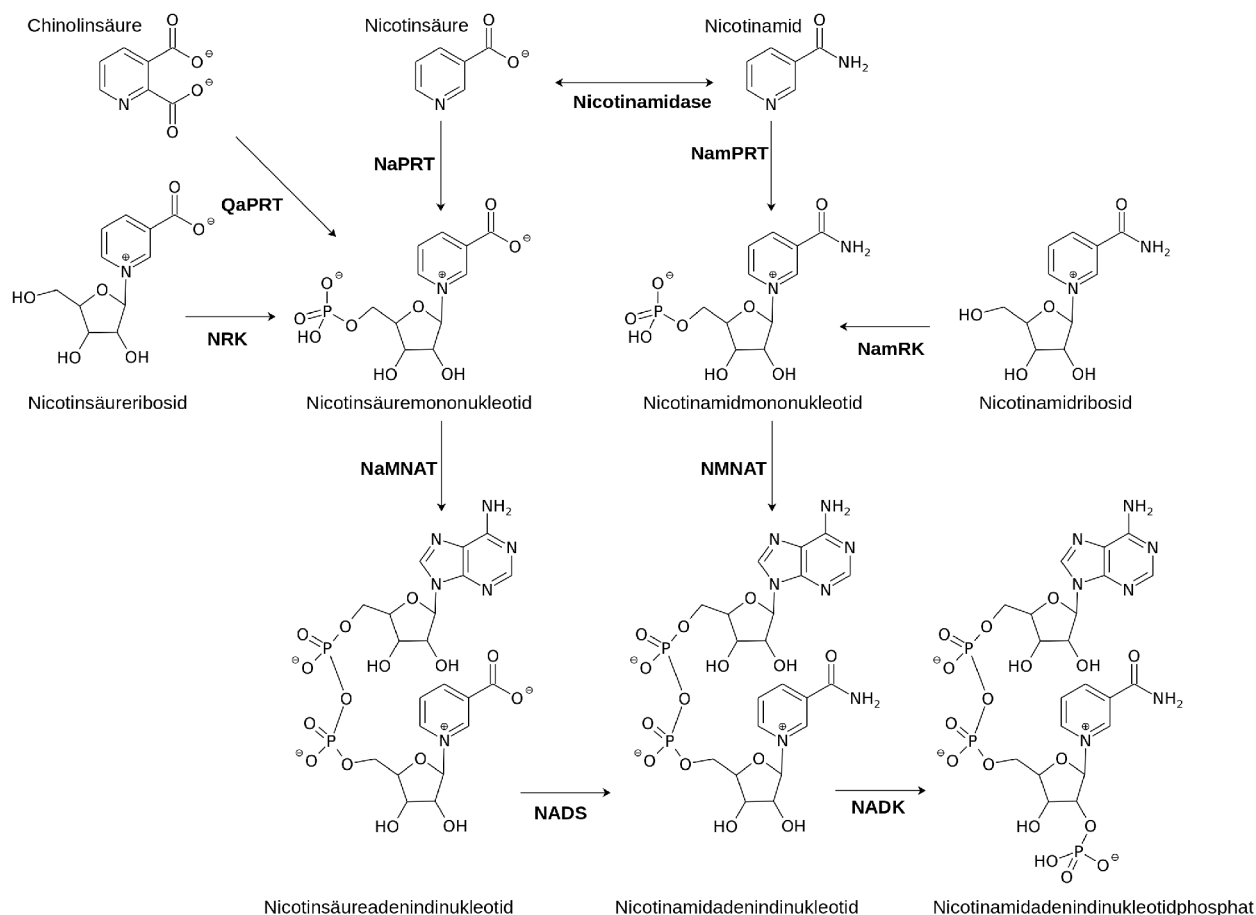


Abb. 1.4: Der NAD(P) Stoffwechsel im Überblick.

Es bestehen verschiedenste Pfade, die eine Synthese von NAD(P) ermöglichen. Die Abbildung konzentriert sich auf die wichtigsten Ausgangssubstanzen und die aus ihnen gebildeten Zwischenprodukte, welche schließlich in der Synthese von NAD(P) resultieren. Die jeweiligen Reaktionspartner sind zu Gunsten einer besseren Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet, sie können jedoch im Fließtext nachgeschlagen werden. Die Abbildung wurde mit GChemPaint erstellt. Sie ist angelehnt an Dölle *et al.* sowie Galassi *et al.* [55][56].

Wie man heute weiß, stellt der Preiss-Handler-Weg jedoch nicht die einzige Möglichkeit zur NAD-Synthese dar. In Tieren wird NAD überwiegend ausgehend von dem Vitamin B3, auch Niacin genannt, abgedeckt. Dabei fasst man unter Niacin neben Nicotinsäure auch Nicotinamid zusammen. Letzteres kann über eine Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase (NamPRT) in Nicotinamidmononukleotid (NMN) überführt werden, wobei ebenfalls PRPP verbraucht wird [55]. Es gibt zudem noch eine weitere Möglichkeit NMN zu erstellen. Nicotinamidribosid kann durch die Nicotinamidribosidkinase (NamRK) ebenfalls in das Mononukleotid NMN verwandelt werden, wobei die nötige Phosphorylgruppe von ATP stammt [57]. NMN kann direkt mit ATP zu NAD fusioniert werden. Katalysiert wird dieser Schritt durch die Nicotinamidmononukleotid-Adenyltransferase (NMNAT) [55]. Interessant ist hierbei, dass es sich bei NaMNAT und NMNAT oftmals um ein und dasselbe Enzym handelt, obwohl man beide für gewöhnlich auch in der EC Nomenklatur voneinander unterscheidet (NaMNAT EC 2.7.7.18, NMNAT EC 2.7.7.1).

Ein Beispiel für diese duale Substratspezifität sind die humanen NMNAT-1 und NMNAT-3 [58]. Damit sind die Wege zur NAD-Synthese jedoch noch immer nicht erschöpft. Auch für Nicotinsäureribosid besteht die Möglichkeit, durch eine Kinase (Nicotinsäureribosidkinase, NRK) in NaMN umgewandelt zu werden. Zuletzt kann auch die essentielle Aminosäure Tryptophan zur NAD-Synthese herangezogen werden. Hierzu muss Tryptophan jedoch zuerst zur Chinolinsäure (Qa) degradiert werden. Aus Qa kann gemeinsam mit PRPP unter Decarboxylierung von Qa ebenfalls NaMN hergestellt werden, katalysiert durch die Qa-Phosphoribosyltransferase (QaPRT) [55]. Zudem kann durch eine Nicotinamidase zwischen Nicotinsäure und Nicotinamid konvertiert werden [59]. In einem letzten Schritt kann aus NAD durch die NAD-Kinase (NADK) schließlich noch NADP erstellt werden.

In Abhängigkeit von dem jeweiligen Organismus kann man schließlich vier verschiedene Wege als Quelle des Pyridinrings für die NAD-Synthese ausfindig machen. Hierzu zählen die *de novo* Synthese, bei dem QA über Tryptophan erstellt wird. Im *salvage pathway* können Nicotinsäure und Nicotinamid recycled werden. Schließlich gibt es noch den Preiss-Handler unabhängigen Syntheseweg, wobei Nicotinamid- und Nicotinsäureribosid durch ihre jeweiligen Kinasen zu den entsprechenden Mononukleotiden umgewandelt werden [56].

1.7.1 NAD(P) und *Plasmodium*

Dass NADP für das Überleben der *Plasmodium* von essentieller Bedeutung ist, da es den Parasiten ermöglicht, mit einem hohen Maß von oxidativem Stress umzugehen, wurde bereits in Abschnitt 1.4 (siehe S. 10ff sowie Abb. 1.3 Seite 11) erörtert. Aber auch NAD scheint für *Plasmodium* von hoher Relevanz zu sein. So konnte bereits 1990 von Zerez *et al.* gezeigt werden, dass in *P. falciparum* infizierten Erythrocyten bei einer Parasitämie von 66 %, der NAD-Gehalt um ungefähr das Zehnfache erhöht war. Die NADP-Konzentration war dagegen nicht signifikant erhöht. Der observierte Anstieg der NAD-Konzentration könnte dabei auf eine erhöhte Aktivität von NaPRT, NamPRT sowie Nicotinamidase in den infizierten Erythrocyten deuten. Die erhöhte NAD-Konzentration scheint dabei auf NAD-Synthese durch Nicotinsäure als auch Nicotinamid zurückzuführen zu sein. Ferner vermuten die Autoren, dass die Parasiten bei ihrer Vermehrung auf größere Mengen NAD angewiesen sind und eine Inhibition der Synthese einen Effekt gegen Malaria ausüben könnte [60]. Diese gemessenen hohen NAD-Konzentrationen erscheinen konsistent mit den Ergebnissen von Olszewski *et al.*, denn die Autoren konnten eine substantielle Verknappung von NAD innerhalb des Kulturmediums später Trophozoiten- sowie Schizontenstadien feststellen [61]. Zudem zeigen Genomdaten, dass Plasmodien die Fähigkeit zur *de novo* Synthese von Purinringen verloren haben. Somit sind sie abhängig von der Aufnahme von Purinnukleotiden und -basen durch den Wirt. Gleiches gilt für die Aufnahme von

Nicotinsäure sowie Nicotinamid [62]. Hieraus folgern Olszewski *et al.*, dass entweder die Aufnahme von Niacin oder die Synthese von NAD ein potentielles *drug target* darstellen [61]. Da der Parasit direkt nach dem Eindringen in Erythrocyten grundlegende Modifikationen der Wirtszelle hervorruft, um einen Austausch von Metaboliten mit dem Wirt zu ermöglichen, erscheint dies nur konsequent [63][61]. Außerdem konnten O'Hara *et al.* nachweisen, dass eine gezielte Inhibition der plasmodialen NaMNAT das Wachstum von *P. falciparum in vivo* hemmt [64].

In Erythrocyten scheint die NAD-Synthese ausschließlich über den *salvage pathway* zu erfolgen. Dabei wird einerseits der Preiss-Handler-Weg genutzt und zudem Nicotinamid sowie Nicotinamidribosid [60][65][64]. Eine Synthese über Chinolinsäure ist nicht gegeben [66]. Nach gegenwärtigen Erkenntnissen verlässt sich *Plasmodium* exklusiv auf den Preiss-Handler-Weg, kann jedoch auch Nicotinamid über eine Nicotinamidase nutzen [64][67].

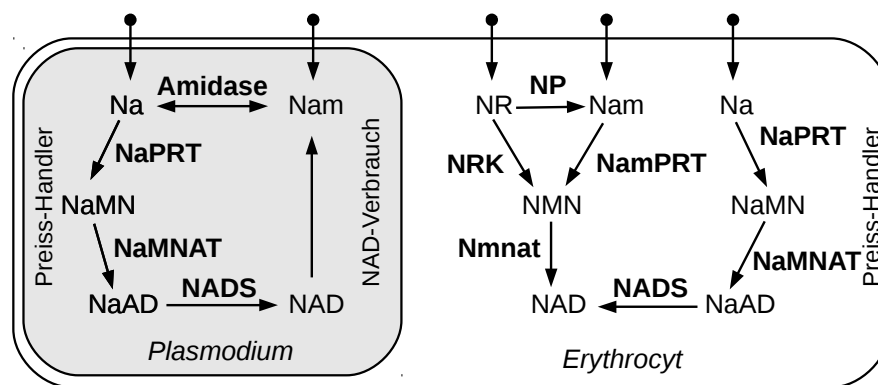


Abb. 1.5: NAD-Metabolismus von *Plasmodium* und Erythrocyt.

Sowohl *Plasmodium* als auch Erythrocyten nutzen zur NAD-Synthese den Preiss-Handler-Weg. Zudem kann der Erythrocyt noch einen Preiss-Handler unabhängigen *salvage pathway* nutzen. Substrate, welche aus dem Medium respektive Erythrocyten aufgenommen werden, sind mit einem Pfeil, der am Ende einen Punkt trägt, gekennzeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PfNaMNAT auch direkt Nam umsetzen kann. Die Abbildung ist angelehnt an O'Hara *et al.* [64]. Die Abkürzungen der Enzyme stimmen mit dem übrigen Text überein. Substrate respektive Produkte sind wie folgt abgekürzt: Na = Nicotinsäure, Nam = Nicotinamid, NaAD = Nicotinsäureadenin dinukleotid, NAD = Nicotinamidadenin dinukleotid, NaMN = Nicotinsäuremononukleotid, NMN = Nicotinamidmononukleotid, NR = Nicotinamidribosid.

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Nach Schätzungen der WHO ist nahezu die Hälfte der Weltbevölkerung (3,4 Milliarden) davon bedroht, an Malaria zu erkranken [15]. Zudem ist Malaria nach wie vor die wichtigste Tropenkrankheit. Das Auftreten medikamentenresistenter *Plasmodium*-Stämme erschwert jedoch zusehends die Behandlung der Krankheit [68][69]. Damit auch in Zukunft eine effiziente Therapie dieser Parasitose gegeben ist, bedarf es eines umfassenden Verständnisses des Stoffwechsels von *Plasmodium*. Dieses Wissen kann schließlich dazu genutzt werden neue potentielle Wirkstoffziele aufzufinden. Ein möglicher Kandidat hierfür ist das antioxidative Abwehrsystem, welches in höchstem Maße von NADPH abhängig ist. Der intraerythocytaire Stoffwechsel von *Plasmodium* verursacht permanent oxidativen Stress. Die dafür verantwortlichen ROS werden über verschiedene antioxidative Effektoren entgiftet wobei NADPH als finales Reduktionsmittel fungiert. NADPH ist somit für das Überleben der Parasiten von zentraler Bedeutung. Zudem weisen infizierte Erythrocyten einen stark erhöhten NAD-Spiegel auf und es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der NaMNAT von *P. falciparum* das Wachstum des Parasiten hemmt. Angesichts dieser Fakten stellt sich die NAD-Synthese von *Plasmodium* als höchst attraktives Wirkstoffziel dar.

Ausgehend von diesen Überlegungen sollten im Rahmen dieser Arbeit einige der Enzyme des Preiss-Handler-Weges bei *P. falciparum* näher untersucht werden. Ziel war dabei eine strukturelle sowie kinetische Charakterisierung. Ein besonderer Fokus wurde auf NaMNAT gelegt, da dieses Enzym eine höchst wichtige Schlüsselposition aufweist. Hierbei sollte die Substratpräferenz der *Plasmodium* NaMNAT genauer untersucht werden, denn von den bekannten NaMNATs können nur einige die beiden Substrate NaMN und NMN in gleichem Maße verwerten. Es konnte gezeigt werden, dass NaMNAT eine duale Substratspezifität aufweist und neben NaMN auch NMN umsetzen kann. Daher ist es möglich, die NADS zu übergehen. Im Weiteren konvergieren sämtliche bekannten NAD-Synthesewege bei NaMNAT. Um die geplanten Untersuchungen durchführen zu können, musste zunächst die heterologe Expression der jeweiligen Gene in *E. coli* etabliert werden. Da die Proteinkristallisation höchste Anforderungen an die Reinheit sowie konformationelle Homogenität der zu kristallisierenden Proteine stellt, mussten adäquate Reinigungsprotokolle etabliert werden. Schließlich sollte, die *ab initio* Kristallisation der PfNaMNAT erzielt werden. Hier galt es zuerst verschiedene Kristallisationsstrategien zu testen, wobei die Kristallisation des Proteins im Rahmen von ca. 15.000 Kristallisationsansätzen optimiert wurde. Eine Herausforderung für jedes Strukturaufklärungsprojekt stellt die Überwindung des Phasenproblems dar. Hierfür galt es eine geeignete Strategie zu finden. Schließlich gelang die Strukturaufklärung der PfNaMNAT in zwei verschiedenen Cokristallisationen. Neben der NaMNAT sollten noch weitere Proteine kristallisiert werden, darunter auch das redoxaktive Protein Plasmoredoxin (Plrx).

2 Material und Methoden

Prozentangaben zu Flüssigkeiten sind ausschließlich als Volumenprozent (v/v) zu verstehen. Die jeweiligen Angaben zu Lösungen von Feststoffen beziehen sich dagegen auf das Gewicht (w/v).

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1))	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	PeqLab, Erlangen
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
APS	Roth, Karlsruhe
6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniummolybdat-Tetrahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
ATP	Roche, Mannheim
Bicin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bis-Tris	Roth, Karlsruhe
Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay)	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Citronensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cystatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
DTT	Roth, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
L-Glutamat-Natriumsalz-Monohydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe

Chemikalien	Hersteller
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, Basingstroke, England
HEPES	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Roth, Karlsruhe
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid (1 M Lsg.)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
MES	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
MPD	Roth, Karlsruhe
NAD ⁺	Biomol, Hamburg
NADH	Biomol, Hamburg
NADP ⁺	Biomol, Hamburg
NADPH	Biomol, Hamburg
NaMN	Sigma-Aldrich, Steinheim
Non-hydrolyzable ATP Test Kit	Jena Bioscience, Jena
NMN	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Natronlauge	Roth, Karlsruhe
PEG 200	Sigma-Aldrich, Steinheim
PEG 400	Sigma-Aldrich, Steinheim
PEG 550-MME	Fluka
PEG 600	Sigma-Aldrich, Steinheim
PEG 1000	Roth, Karlsruhe
PEG 1500	Roth, Karlsruhe
PEG 2000-MME	Fluka
PEG 3000	Merck, Darmstadt
PEG 3350	Sigma-Aldrich, Steinheim
PEG 4000	Roth, Karlsruhe
PEG 5000-MME	Sigma-Aldrich, Steinheim
PEG 6000	Sigma-Aldrich, Steinheim & Roth, Karlsruhe
PEG 8000	Roth, Karlsruhe
PEG 10000	Sigma-Aldrich, Steinheim

Chemikalien	Hersteller
PEG 20000	Roth, Karlsruhe
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphatdetektionskit, MicroMolar Phosphate Assay Kit	ProFoldin, Hudson, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rhamnose	Becton Dickinson, Heidelberg
Rubidiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
TCEP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Temed	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tiazofurin	Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada
TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypton/Pepton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe

2.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Webeco, Bad Schwartau
Autoklav VX-95	Systec, Wettenberg
Brutschrank Function Line T 12	Heraeus, Hanau
Digitalscanner Scanjet 4070 Photosmart	Hewlett-Packard GmbH, Böblingen
Digitalthermometer GTH1160	Greisinger Electronic, Regenstauf
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammern B1, B1A, B2	Owl Separation Systems Inc., Portsmouth, USA
Elektroporator, Einzelkomponenten:	Bio-Rad, München
• GenePulser Xcell	
• Shock Pod	
• CE Modul	
• PC Modul	
Feinwaage ABT 120-5 DM	Kern, Balingen
Feinwaage AJ100	Mettler-Toledo, Gießen
Filmentwickler Optimax TR	MS Laborgeräte, Heidelberg
Flockeneisbereiter F80C	Icematic Deutschland, Meerbusch
FPLC-System Äkta, Einzelkomponenten:	GE Healthcare, Freiburg
• Pumpe P-920	
• Monitor UPC-900	

Gerät	Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> Valve INV-907 Mixer M-925 Fraktionssammler Frac-900 Säule XK16/60 	
Geldokumentationsanlage GelDoc 2000	Bio-Rad, München
Heizblock neoBlock II	neoLab, Heidelberg
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Kristallisationsroboter Honeybee 961 mit	Digilab, Marlborough, USA
<ul style="list-style-type: none"> Peristaltikpumpe Masterflex® US® Vakuumpumpe 6035A080-02 	
Kristallisationsroboter mosquito Crystal	TTP Labtech, Melbourn, England
Inkubationsschüttler, Einzelkomponenten:	B. Braun, Melsungen
<ul style="list-style-type: none"> Heizeinheit certomat® H Schütteleinheit certomat® R 	
Inkubationsschüttler, Einzelkomponenten:	Thermo Scientific, Dreieich
<ul style="list-style-type: none"> Brutschrank mytron Orbital Shaker 	
Inkubationsschüttler KS 500	Junke & Kunkel, IKA®-Werke, Staufen
Inkubationsschüttler SM25	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Magnetrührer RCTbasic	IKA®-Werke, Staufen
Magnetrührer color squid	IKA®-Werke, Staufen
Mehrkanalpipette Discovery 1 – 10 µl	HTL Lab Solutions, Warschau, Polen
Mehrkanalpipette Discovery 20 – 200 µl	HTL Lab Solutions, Warschau, Polen
Mehrkanalpipette Transferpette 2 – 20 µl	BRAND GmbH, Wertheim
Mehrkanalpipette Viaflo 125 µl (elektronisch)	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Mikrotiterplatten-Leser Infinite M200	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
PCR-Cycler Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
PCR-Cycler Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Knick, Berlin
Pipette Eppendorf Research 0,1 – 2,5 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson, Middleton, USA
Pipettierroboter Lissy	Zinsser Analytic, Frankfurt
Reinstwasseranlage Optilab Plus	MembraPure, Henningsdorf
Spektrophotometer Beckman DU 650	Thermo Scientific, Dreieich
Spektrophotometer Genesys 10 UV scanning	Thermo Scientific, Dreieich
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific, Dreieich
Spektrophotometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Spektrophotometer U-2001	Hitachi, Schwäbisch Gmünd
Spannungswandler Power Pac 300 und 1000	Bio-Rad, München
Stereomikroskopiesystem, Einzelkomponenten:	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
<ul style="list-style-type: none"> Mikroskop M165 C 	

Gerät	Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> • Beleuchtung KL1500 LED • Kamera EC 3 	
Stereomikroskopiesystem, Einzelkomponenten:	Nikon GmbH, Düsseldorf
<ul style="list-style-type: none"> • Mikroskop SMZ1000 • Standfuß C-DSS230 	
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall-Homogenisator Sonopuls GM2070	Bandelin, Berlin
Ultraschallwasserbad Sonorex RK100	Bandelin, Berlin
Vakuumzentrifuge, Einzelkomponenten:	Savant, Thermo Scientific, Dreieich
<ul style="list-style-type: none"> • SpeedVac® SPD111V • GelPump GP110 	
Vortex-Mixer MS2 Minishaker	IKA®-Werke, Staufen
Waage 474-32 (0,5 – 620 g)	Kern, Balingen
Waage 440-47N (bis 2 kg)	Kern, Balingen
Western Blot Trans-Blot® SD Semi-dry transfer cell	Bio-Rad, München
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Thermo Scientific, Dreieich
Zentrifuge Sorvall RC 6+	Thermo Scientific, Dreieich
Zentrifugenrotoren SS-34 und F9S-4x1000y	Thermo Scientific, Dreieich

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Abdeckfolie, EasySeal™ transparent 79 x 135 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Abdeckfolie, Silverseal, Aluminium 80 x 140 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Alufolie alio	FORA Folienfabrik GmbH, Radolfzell
Chemolumineszenzfilm Amersham Hyperfilm™ ECI	GE Healthcare, Freiburg
Deckgläser Ø 21 mm	Gerhard Menzel GmbH (Thermo Scientific), Braunschweig
Deckgläser Ø 22 mm, rund, silikonisiert	Greiner Bio-One, Frickenhausen
DNA-Auftragspuffer 6x	Thermo Scientific, Dreieich
DNA-Dye NonTox	Applchem GmbH, Darmstadt
Einmalröhrchen, PP, 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einmalröhrchen, PP, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einwegspritzen 1 ml Plastipak™	Becton Dickinson, Madrid, Spanien
Einwegspritzen 10 ml	B. Braun, Melsungen

Material	Hersteller
Elektroporationsküvette, Gene Pulser 0,2 cm	Bio-Rad, München
Entsorgungsbeutel	Roth, Karlsruhe
Filtereinheit Rotrand 0,2 µm	Whatman GmbH, Dassel
Frischhaltefolie alio	Wentus Kunststoff GmbH, Höxter
Glaskapillaren/Mikropipetten 10 µl	BRAND GmbH, Wertheim
Halb-Mikro-Küvette 10 x 4 x 45 mm, Polystyrol	SARSTEDT, Nümbrecht
Kanüle 0,70 x 50 mm	Unimed, Lausanne, Schweiz
Klarsichtklebeband, Crystal Clear	MANCO® Inc., Avon, USA
Klarsichtklebeband, HDClear	ShurTec Brands, Avon, USA
Kristallisationsplatte, 24 well, VDX Plate	Hempton Research, Aliso Viejo, USA
Kristallisationsplatte, 96 well, MRC 2 well	Jena Bioscience, Jena
Linsenpapier	Glaswarenfabrik Karl Hecht - "Assistent", Sondheim
Masterblock, 96 well, 2 ml, V-Boden, natur	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Membranfilter ME 25 0,45 µm Ø 50 mm	Whatman GmbH, Dassel
Microplatte, 96 well, PP, V-Boden, transparent	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Microplatte, 96 well, PP, half area, fester Boden, transparent	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Multiply® PCR-Einzelgefäß 0,2 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Parafilm M PM-996	Bemis, Neenah, USA
Pasteurpipetten 150 mm Länge	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pasteurpipetten 150 mm Länge	Wilhelm Ulbrich GdbR (WU Mainz), Bamberg
Peleusball	Deutsch & Neumann, Berlin
Petrischalen 94x16	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitze VIAFLO GRIPTIPS 125 µl, unsteril	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Pipettenspitze 200 µl	SARSTEDT, Nümbrecht
Pipettenspitze kristall, Volumen 0,1 – 10 µl	ratiolab®, Dreieich
Pipettenspitze blau, Volumen 100 – 1000 µl	ratiolab®, Dreieich
Pipettenspitzen Omnitip™ FastRack 10 µl	ULPLAST, Warschau
Pipettenspitzen Omnitip™ FastRack 200 µl	ULPLAST, Warschau
Polybead® Polystyrene 0,05 Micron	Polysciences, Inc. Warrington USA
Microspheres	
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz-Rheinhafen
Roti®-PVDF-Membran	Roth, Karlsruhe
SafeSeal Reagiergefäß, 0,5 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
SafeSeal Reagiergefäß, 1,5 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
SafeSeal Reagiergefäß, 2 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Serologische Pipetten, 5, 10 und 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Silikonöl 550	Merck, Darmstadt
UV-Küvette mikro	BRAND, Wertheim
Zentrifugalkonzentrator Vivaspin 20, 3.000	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen

Material	Hersteller
MWCO	
Zentrifugalkonzentrator Vivaspin 20, 10.000 MWCO	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Zentrifugalkonzentrator Vivaspin 20, 20.000 MWCO	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Chromatographiematerial	Hersteller
Nickel-NTA-Agarose	Invitrogen, Carlsbad, USA
Superdex 200 prep grade	GE Healthcare, Freiburg
TALON® Metal Affinity Resin	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA

2.1.4 Komplettsysteme

Material	Hersteller
HiSpeed® Plasmid Midi Kit (25)	QIAGEN, Hilden
PureYield™ Plasmid Miniprep System	Promega, Madison, USA
QIAquick® PCR Purification Kit (250)	QIAGEN, Hilden
QIAquick® Spin Miniprep Kit (250)	QIAGEN, Hilden
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Madison, USA

2.1.5 Enzyme

Restriktionsenzym	Hersteller	Verwendung	Erkennungssequenz
AluI	Fisher BioReagents	Kontrollverdau	5'...A [^] GCT...3'
DpnI	Thermo Scientific	Eliminierung von Ursprungsplasmiden	5'...GA ^{CH3^} TC...3'
BamHI (FastDigest)	Thermo Scientific	Klonierung	5'...G [^] GATCC...3'
HindIII (FastDigest)	Thermo Scientific	Klonierung	5'...A [^] AGCTT...3'
NcoI (FastDigest)	Thermo Scientific	Klonierung	5'...C [^] CATGG...3'
XhoI (FastDigest)	Thermo Scientific	Klonierung	5'...C [^] TCGAG...3'

Enzyme für PCR	Hersteller	Verwendung
Pfu DNA Polymerase	Promega	DNA-Amplifikation
GoTaq DNA Polymerase	Promega	DNA-Amplifikation
VELOCITY DNA Polymerase	Bioline	DNA-Amplifikation

Weitere Enzyme	Hersteller	Verwendung
DNase I	Roche	DNA-Degradation bei Zelllyse
Lysozym	Sigma	Zelllyse und Proteinkristallisation
Pyrophosphatase (anorganisch aus Hefe)	Sigma	Enzym-Assays
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific	Ligation von DNA-Fragmenten

2.1.6 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-His ₆ -Tag monoklonaler Antikörper unkonjugiert, aus Maus	Dianova, Hamburg
Anti-Maus IgG (H+L) Peroxidase-konjugiert, aus Ziege	Dianova, Hamburg

2.1.7 Zellstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Hersteller	Verwendung
BL21	Invitrogen	Proteinsynthese
KRX	Promega	Plasmidpräparationen, Proteinsynthese
M15	QIAGEN	Proteinsynthese
XL1-Blue	Agilent Technologies	Plasmidpräparationen

2.1.8 Vektoren

Name	Hersteller	Antibiotikaresistenz
pET28a	Novagen	Kan
pET28a-NaMNAT	Eigenherstellung	Kan
pET28a-NaMNAT-C41A	Eigenherstellung	Kan
pET28a-NaMNAT-C43A	Eigenherstellung	Kan
pET28a-NaMNAT-C41A-C43A	Eigenherstellung	Kan
pET28a-NaPRT	Eigenherstellung	Kan
pQE30	QIAGEN	Amp
pQE30-NaPRT	Eigenherstellung	Amp
pRSET A	Invitrogen	Amp
pRSET A-NaPRT	Eigenherstellung	Amp

2.1.9 Oligonukleotide

Name	Sequenz
NaMNAT C41A	5'-CATTTCTACATCTAGCTATAACTACCCA-3'
NaMNAT C43A	5'-GATTATCATTCTAGCTCTACATATAAC-3'
NaMNAT C41A C43A	5'-GATTATCATTCTAGCTCTAGCTATAACTACCCA-3'
NaMNAT-NcoI (for)	5'-CGCCATGGGCCATAAGAATATATGTATATATGGAGGGTC-3'
NaMNAT-XhoI (revI)	5'-GCGCCTCGAGATTAAAATCATATAAGTTATACTTTATAATATAATC-3'
NaPRT-HindIII	5'-GCGCAAGCTTTTATTGATTTATGTGAGAATTTTTTATGAG-3'
NaPRT-NcoI	5'-CCACCATGGGACAAGGTAACAGGGAAAACCTCCAAAG-3'
NaPRT-XhoI	5'-CCTCATAAAAAATTCTCACATAAATCAACTCGAGGAG-3'
NaPRT-Seq1	5'-GTATGGAAGAAGGATCTGTTG-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7 term (AG Becker)	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

2.1.10 Größenstandards

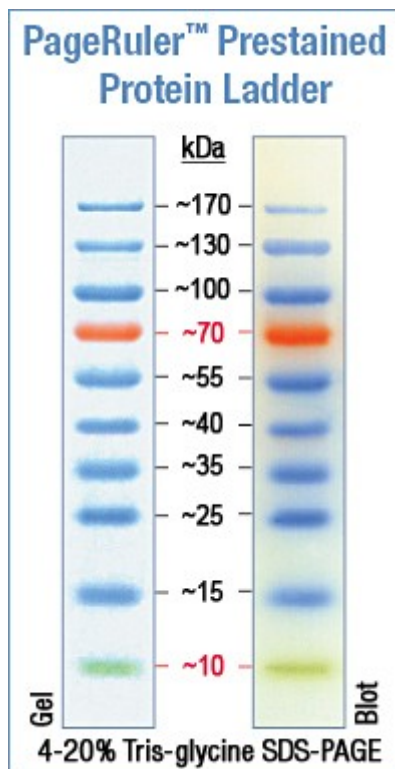


Abb. 2.1: Größenstandard für die Proteinreinigung sowie Western Blots.

2.1.11 Kristallisations-screens

Zur Durchführung von Proteinkristallisationsexperimenten wurden verschiedene kommerziell erhältliche Kristallisationsscreens verwendet.

Kristallisationsscreen	Hersteller
Additive Screen HT HR2-138	Hampton Research, Aliso Viejo, USA
JBScreen Classic HTS I	Jena Bioscience, Jena
JBScreen Classic HTS II	Jena Bioscience, Jena
JBScreen Wizard 1 HTS	Jena Bioscience, Jena
JBScreen Wizard 2 HTS	Jena Bioscience, Jena
JCSG Core Suite I (NeXtal Tubes)	QIAGEN, Hilden
JCSG Core Suite II (NeXtal Tubes)	QIAGEN, Hilden
JCSG Core Suite III (NeXtal Tubes)	QIAGEN, Hilden
JCSG Core Suite IV (NeXtal Tubes)	QIAGEN, Hilden
MPD Suite (PrNeXtal DWBlock)	QIAGEN, Hilden

Darüber hinaus kamen einige in der AG Becker selbst erstellte Kristallisationsscreens zum Einsatz. Die einzelnen *screens* wurden unter Nutzung des Pipettierroboters „Lissy“ erstellt.

2.1.12 Verwendete Software

Diese Arbeit wurde größtenteils unter Verwendung von freier Software erstellt. Als Betriebssystem kamen verschiedene Versionen von openSUSE und Ubuntu, beides Linux-Derivate, zum Einsatz. Unter diesen beiden Systemen erfolgte auch die kristallographische Datenauswertung. Sofern Windows benötigt wurde, wurde es mittels VirtualBox virtualisiert. Die folgende Liste gibt einen Überblick über die genutzten Anwendungsprogramme.

ClustalX und ClustalW: Erstellen von Alignments für Sequenzvergleiche beim Klonieren.

T-Coffee: Erstellen von strukturbasierten Alignments, zum Vergleich verschiedener NaMNATs.

Jalview: Visualisierung von mit Clustal erstellten Alignments.

FinchTV: Visualisierung von Chromatogrammen von DNA-Sequenzierungen.

Chimera und PyMol: Darstellung von Proteinmodellen. Hiermit wurden auch Strukturüberlagerungen der verschiedenen homologen NaMNATs erstellt. Mit Chimera wurden zudem Abstände innerhalb von Proteinmodellen vermessen sowie potentielle H-Brücken identifiziert.

Coot und O: Diese beiden Programme dienten zur Darstellung von Elektronendichten sowie dem Bearbeiten der Proteinmodelle.

Phenix und CNS: Im Laufe des Verfeinerungsprozesses wurden hiermit neue Elektronendichten sowie Proteinmodelle berechnet.

XDS: Dieses Programm diente zur Modellierung gemessener Reflexionen, der Integration ihrer Intensitäten, der Korrektur und dem Skalieren der Daten sowie der Bestimmung der Raumgruppe.

GChemPaint: Hiermit wurden chemische Strukturformeln gezeichnet.

DSSP: Mit diesem Programm konnten Sekundärstrukturen von Proteinmodellen bestimmt werden.

dssp2pdb: Die durch DSSP bestimmten Sekundärstrukturmodule konnten hiermit in eine PDB-Datei übertragen werden.

LibreOffice: Mit dieser Sammlung von Office-Programmen wurde die Arbeit selbst erstellt. Zudem diente das Tabellenkalkulationsmodul zur Auswertung von Proteinkinetiken, nach Michaelis-Menten. Hierzu wurde eine nicht lineare Regression erstellt. Zum Lösen der Regression diente der *SCO Evolutionary Algorithm* (Voreinstellungen: Beendigungsgrenze 70, Beendigungstoleranz: 0,000001, Größe der Bibliothek: 210, Lernzyklen: 2000, Schwarmgröße: 70, Variablengrenzbereich: 3, Variablengrenze raten: ja). Zudem wurde mit einer weiteren Tabellenkalkulation die Schmelztemperatur von Primern berechnet.

QtPfsGui: Hiermit wurden Belichtungsreihen einzelner Kristalle zu einem einzelnen Bild mit erweitertem Dynamikumfang verarbeitet (*high dynamic range*, HDR).

JConcentrationConverter: Dieses selbst erstellte Java-Programm diente dem Berechnen von Konzentrationsverhältnissen innerhalb von Ligationsansätzen.

Zudem kamen einige Web-basierte Dienste zum Einsatz (die Adressen wurden am 14.10.2014 abgerufen):

SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>): Zum Erstellen von Homologiemodellen.

SIAS (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>): Zur Berechnung von Identitäten und Ähnlichkeiten zweier Sequenzen.

GIF/PNG-Creator for 2D Plots of Chemical Structures (<http://cactus.nci.nih.gov/gifcreator/>): Zum Erstellen von Strukturformeln aus SMILES-Codes.

2.2 Mikrobiologische Methoden

Für verschiedenste mikrobiologische Arbeitsschritte fand das Enterobakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) Verwendung. Die zur Anzucht des Bakteriums genutzten Nährmedien wurden durch

Autoklavieren bei 120 °C für 30 min bei einem Druck von 2,5 bar sterilisiert. Nicht mehr benötigte Bakterienkulturen wurden auf analoge Weise entsorgt. Weitere zur Arbeit genutzte Geräte wurden ebenfalls durch Autoklavieren oder ein Ethanolbad mit anschließendem Abflammen sterilisiert. Da alle Arbeitsschritte auf einer normalen Laborwerkbank erfolgten, wurden verschiedene Maßnahmen getroffen, um Kontaminationen mit Fremdbakterien zu vermeiden. Hierzu zählen der stete Zusatz von Antibiotika zu den Kulturmedien, die kürzest mögliche Exposition der Kulturmedien gegenüber der Umgebung sowie ein in der Nähe befindlicher, entzündeter Bunsenbrenner, um das Sedimentieren in der Luft befindlicher Keime zu minimieren.

2.2.1 Anzucht von *E. coli* Zellen in Nährmedien

Die Anzucht von *E. coli* Kulturen erfolgte unter Nutzung von Flüssig- sowie Festmedien. Dabei kamen *lysogeny broth* (LB), *terrific broth* (TB) und 2xYT-Medium zum Einsatz. Festmedien beschränkten sich auf die Nutzung von LB-Agarplatten, welche durch den Zusatz von 1,5 % Agarose zu flüssigem LB-Medium entstanden. Sämtliche Medien wurden durch Autoklavieren sterilisiert.

Zur Anzucht der *E. coli* Zellen wurden den Kulturmedien stets Antibiotika hinzugefügt. Dies diente nicht nur der Vermeidung einer Kreuzkontamination mit Bakterien aus der Umgebung, sondern auch der Selektion von Bakterien mit und ohne gewünschtem Plasmid. Außerdem gewährleistete dieser Selektionsdruck ein Persistieren der gewünschten Plasmide innerhalb der Zellpopulation. Da Antibiotika für gewöhnlich hitzelabil sind, konnten sie den Kulturmedien erst im Anschluss an das Autoklavieren hinzugefügt werden, wenn diese bereits leicht abgekühlt waren. Anstelle von Ampicillin wurde Carbenicillin verwendet, welches weniger leicht degradiert werden kann und bei niedrigen pH-Werten eine höhere Stabilität aufweist.

Endkonzentration der Antibiotika	Agar-Platten & Flüssigmedien
Carbenicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

LB-Medium	LB-Agarplatten	TB-Medium	2xYT-Medium
10 g Trypton	10 g Trypton	12 g Trypton	16 g Trypton
5 g Hefeextrakt	5 g Hefeextrakt	24 g Hefeextrakt	10 g Hefeextrakt
10 g NaCl	10 g NaCl	9,4 g K ₂ HPO ₄	5 g NaCl
ad. 1 l H ₂ O	15 g Agarose	2,2 g KH ₂ PO ₄	ad. 1 l H ₂ O
	ad. 1 l H ₂ O	4 ml Glycerin	

LB-Medium	LB-Agarplatten	TB-Medium	2xYT-Medium
-----------	----------------	-----------	-------------

ad. 1 l H₂O

2.2.1.1 Arbeiten mit *E. coli* Zellen

In dieser Arbeit kamen verschiedene *E. coli* Stämme für präparative Zwecke zum Einsatz. Einerseits sind dies die Amplifikation von Plasmid-DNA im Rahmen von Klonierungen, Mutagenesen sowie generell Plasmidpräparationen und andererseits die Synthese rekombinanter Proteine. Je nach den gegebenen Anforderungen kamen dabei verschiedene Kulturmedien und Volumina zum Einsatz. Es wurden jedoch nicht nur die Kulturmedien variierten, sondern darüber hinaus auch noch die Dauer des Bakterienwachstums sowie die Inkubationstemperaturen. Da in *E. coli* temperaturabhängig verschiedene Chaperone exprimiert werden, kann man die Qualität der Proteinproduktion teilweise über verringerte Temperaturen optimieren [70]. Der verlangsamte Metabolismus und die somit verringerte Proteinsynthese werden hierbei durch eine verlängerte Wachstumsperiode kompensiert. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37 °C in verschiedenen temperaturregulierten Luftschüttlern oder alternativ bei Raumtemperatur (RT), gleichfalls in Luftschüttlern.

Volumen	Gefäß	Verwendungszweck	Temperatur
3 ml	Glasröhrchen	Miniprep	37 °C
10 ml	Glaskolben	Miniprep	37 °C
100 ml	Glaskolben	Vorkultur für Expression	37 °C
500 ml	Glaskolben (mit oder ohne Schikane)	Expression	37 °C oder RT
1000 ml	Glaskolben (mit oder ohne Schikane)	Expression	37 °C oder RT

Im Verlauf von Transformationen oder um Kolonien aus Flüssigkulturen zu vereinzeln, wurden kleine Volumina von Flüssigkulturen auf Agarplatten mit einem Drigalskispatel ausgestrichen. Die Inkubation von Agarplatten erfolgte stets bei 37 °C meist über Nacht. Nach dem Erscheinen einzelner, gut sichtbarer Klone auf den Platten wurden diese entweder direkt für weitere Arbeitsschritte verwendet oder bis zu ihrer Nutzung bei 4 °C in einem Kühlschrank gelagert. Die langfristige Lagerung einzelner *E. coli* Kulturen erfolgte jedoch bei -80 °C in einem Tieftemperaturkühlschrank in Form von einer Glycerinkultur.

2.2.1.2 Verwendete *E. coli* Stämme

Die im Laufe dieser Arbeit genutzten *E. coli* Stämme sollen im folgenden Abschnitt inklusive ihrer Genotypen, Eigenschaften sowie Verwendungszwecke genauer beschrieben werden. Die Beschreibung der wichtigsten Charakteristika der Stämme wurden den Herstellerhandbüchern entnommen.

XL-1 Blue

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' *proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)*]

Dieser Stamm wurde zur Amplifikation von Plasmid-DNA herangezogen. Hierfür zeichnet er sich durch mehrere Mutationen besonders aus. Es sind dies eine Endonukleasedefizienz (*endA*) zur Qualitätssteigerung von Minipreps, eine Rekombinasedefizienz (*recA*) zur Steigerung der Insertstabilität und die *hsdR*-Mutation, die eine Degradierung der klonierten DNA durch das EcoK Endonukleasesystem verhindert. Außerdem ermöglicht der XL-1 Blue Stamm eine blau-weiß-Selektion rekombinanter Plasmide. Dieses Merkmal wurde in dieser Arbeit jedoch nicht nutzbar gemacht.

KRX

[F' *traD36 ΔompP proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15*] *ΔompT endA1 recA1 gyrA96 (Nal^r) thi-1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) e14- (McrA-)* *relA1 supE44 Δ(lac-proAB) Δ(rhaBAD)::T7 RNA Polymerase*]

Der KRX Stamm sticht dadurch hervor, dass er nicht nur für Klonierungszwecke genutzt werden kann, sondern auch über ein T7-Expressionssystem verfügt. KRX Zellen teilen sich mit XL1-Blue Zellen die Endonuklease- (*endA*) und Rekombinasedefizienz (*recA*) sowie *hsdR*-Mutation. Eine blau-weiß-Selektion ist ebenfalls möglich. Das chromosomal vorhandene T7 RNA-Polymerasegen steht unter der Kontrolle eines Rhamnosepromotors (*rhaP_{BAD}*). KRX war der im Laufe dieser Arbeit am häufigsten verwendete Zellstamm, sowohl für die Amplifikation von Plasmid-DNA als auch für die Proteinproduktion.

BL21(DE3)

[F' *ompT hadS_B (r_B-m_B-)* *gal dcm* (DE3)]

Dieser Stamm diente ebenfalls der Proteinsynthese, wurde jedoch seltener genutzt als KRX Zellen. Wiederum handelt es sich um ein T7-Expressionssystem. Die T7 RNA-Polymerase unterliegt hier jedoch der Kontrolle durch einen *lacUV5* Promotor. Die Expression der T7 RNA-Polymerase wird hierbei mittels IPTG induziert.

M15

[NaI^S, Str^S, Rif^S, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺]

M15 Zellen wurden ebenfalls für die heterologe Genexpression verwendet. Dabei wurden sie in Verbindung mit pQE-Plasmidvektoren genutzt, da es sich hier um ein aufeinander abgestimmtes Expressionssystem handelt. pQE-Vektoren weisen einen T5-Promotor auf, welcher durch die endogene *E. coli* RNA Polymerase erkannt wird. Ein Lac-Operator dient dabei zur Kontrolle der Proteinsynthese. Die Induktion erfolgte mit IPTG.

2.2.2 Plasmidvektoren

Die Angaben zu den einzelnen Plasmiden wurden den Handbüchern der jeweiligen Hersteller entnommen.

pET-28a(+)

Das Plasmid pET28a war der in dieser Arbeit für die Genexpression bevorzugt eingesetzte Vektor. Die *multiple cloning site* (MCS) dieses Vektors zeigt N-terminal die folgende Konfiguration: His-Tag/Thrombin/T7-Tag. Optional kann auch ein C-terminaler His-Tag verwendet werden. pET28a trägt ein Kanamycinresistenz- und ein lacI-Gen. Der MCS ist ein T7-Promotor/Lac-Operator sowie eine ribosomale Bindungsstelle (RBS) vorausgestellt.

Dieser Vektor wurde für die Produktion von NaMNAT und NaPRT genutzt. Interessanterweise zeigte sich, dass für die Expression der einklonierten Gene keine Induktion mit IPTG erforderlich war. Da dieses Plasmid in Verbindung mit KRX Zellen genutzt wurde, genügte die Induktion der Expression des T7 RNA-Polymerasegens mit Rhamnose.

pQE30

pQE30 ist ein Vektor, der die Genexpression durch ein T5 Promotor/Lac-Operator-Element kontrolliert. Dieser Promotor wird durch die *E. coli* RNA-Polymerase erkannt. Um eine *leaky*-Expression weitestgehend zu unterdrücken, weist dieser Vektor zwei hintereinander geschaltete Lac-Operatoren auf. Der MCS ist ein N-terminaler His-Tag vorangestellt. C-terminal der MCS liegen drei Stop-Codons in verschiedenen Leserastern vor. Ein β -Lactamasegen codiert für eine Ampicillinresistenz. Die Induktion der Expression erfolgte hier durch IPTG.

Dieser Vektor wurde zur Produktion von NaPRT und von Plrx herangezogen.

pRSET A

Dieser Vektor dient ebenfalls der Genexpression. Die gezielte Proteinsynthese wird dabei durch einen T7-Promotor ermöglicht. Das in pRSET A einklonierte Gen wird nicht durch eine zusätzliche Operatorsequenz kontrolliert. Um dessen Transkription zu ermöglichen, muss ein Zellstamm verwendet werden, welcher die T7 RNA-Polymerase bereitstellt. Deren Expression wird dabei für gewöhnlich durch IPTG induziert und somit auch die Synthese des eigentlichen Zielgens. *Upstream* der MCS liegt eine Sequenz, die für einen His-Tag codiert sowie eine Enterokinaschnittstelle beinhaltet. Diese Schnittstelle soll das Abspalten des N-terminalen Fusionspeptids im Anschluß an eine Proteinreinigung ermöglichen. Eine Selektionsmöglichkeit ist über eine Ampicillinresistenz gegeben.

Dieser Vektor wurde ebenfalls zur Produktion von NaPRT genutzt.

2.2.3 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

E. coli ist normaler Weise nur bedingt dazu in der Lage DNA aus dem umgebenden Milieu aufzunehmen (die sog. Kompetenz). Die Aufnahme nackter Plasmid-DNA ist jedoch unabdingbare Prämisse für alltägliche Laborarbeiten wie molekulare Klonierung und Proteinsynthese. Durch spezielle Vorbehandlungen kann *E. coli* Zellen jedoch die nötige Kompetenz verliehen werden. In dieser Arbeit wurden zwei Verfahren genutzt, um chemisch kompetente Zelle zu erstellen.

2.2.3.1 Calciumchlorid basiertes Verfahren

1. Zuerst wurde der jeweilige Zellstamm durch Ausplattieren auf einer Agarplatte vereinzelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.
2. Mit einer so erhaltenen einzelnen Bakterienkolonie wurde eine 3 ml LB-Vorkultur über Nacht herangezogen.
3. Es schloß sich das Animpfen einer 100 ml LB-Hauptkultur mit 1 ml der Vorkultur an. Es folgte die Inkubation bei 37 °C in einem Luftschüttler bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5.
4. Die Kultur kühlte anschließend für ca. 5 min auf Eis ab.
5. Je 50 ml der Bakteriensuspension wurden in ein 50 ml Greinergefäß überführt und für 6 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Megafuge).
6. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 1 ml 4 °C kalter Lösung A

resuspendiert, jeweils auf 20 ml aufgefüllt und schließlich für 30 min auf Eis inkubiert.

7. Danach folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 6 min bei 4000 rpm und 4 °C.
8. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet mit 5 ml 4 °C kalter Lösung B resuspendiert.
9. Die erhaltene Zellsuspension wurde in Aliquots à 100 µl aufgeteilt.
10. Abschließend wurden diese Aliquots in flüssigem Stickstoff bei -196 °C schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

Lösung A	Lösung B
50 mM CaCl ₂	100 mM CaCl ₂
10 mM Tris/HCl pH 8,0	10 mM Tris/HCl pH 8,0
	15 % Glycerin

2.2.3.2 Rubidiumchlorid basiertes Verfahren

Dieses Verfahren zum Erstellen kompetenter *E. coli* Zellen ist dem Vorgehen des Calciumchlorid basierten Verfahrens überwiegend analog. Wie der Name schon impliziert, ergibt sich der grundlegende Unterschied in der Verwendung von Rubidiumchlorid statt des Calciumchlorids. Daher sollen hier nur die direkt abweichenden Arbeitsschritte angegeben werden:

6. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 1 ml 4 °C kalter Lösung A resuspendiert, jeweils auf 15 ml aufgefüllt und schließlich für 90 min auf Eis inkubiert.
8. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet mit 2 ml 4 °C kalter Lösung B resuspendiert.
9. Die erhaltene Zellsuspension wurde in Aliquots à 70 µl aufgeteilt.

Lösung A	Lösung B
100 mM RbCl	10 mM MOPS/HCl pH 5,8
50 mM MnCl ₂	10 mM RbCl
30 mM Kaliumacetat/HCl pH 5,8	75 mM CaCl ₂
10 mM CaCl ₂	
15 % Glycerin	

2.2.4 Transformationen von *E. coli* Zellen

Die Aufnahme von Fremd-DNA durch *E. coli* Zellen, die sog. Transformation, wurde in dieser Arbeit überwiegend durch das Verfahren der Calciumchloridpräzipitation erzielt [71]. Diese Methode stellt sozusagen den Klassiker unter den Transformationsprotokollen dar, die Rubidiumchlorid-Methode ist dabei nur eine Abwandlung der Calciumchloridpräzipitation, um die Ausbeute transformierter Zellen zu steigern [72].

2.2.4.1 Calciumchloridpräzipitation

Bei diesem Verfahren kamen sowohl in der AG Becker erstellte kompetente Zellen zum Einsatz als auch kommerziell erhältliche KRX Zellen.

1. Ein Aliquot kompetenter Zelle wurde auf Eis aufgetaut.
2. Es folgte der Zusatz der gewünschten Menge Plasmid-DNA und ein Vermischen mit den Bakterien durch Rühren mit der Pipettenspitze.
3. Die so erhaltene Zellsuspension wurde für 30 min bis zu 1 h auf Eis inkubiert.
4. Durch abruptes Überführen in einen auf 42 °C vorgewärmten Heizblock erfolgte ein Hitzeschock für eine Dauer von bis zu 2 min.
5. Danach wurden die Zellen für weitere 5 min auf Eis inkubiert.
6. Es wurden 800 µl LB Medium zu der Zellsuspension hinzugefügt.
7. Hierauf schloss sich eine einstündige Inkubationsphase bei 37 °C in einem Schüttler an.
8. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden 100 µl der Zellsuspension direkt auf eine Agarplatte ausgestrichen (mit Beachtung der jeweiligen Antibiotikaresistenz). Die verbliebenen Zellen wurden durch Zentrifugieren pelletiert, der Überstand bis auf ein Restvolumen von ca. 200 µl abgenommen und mit dem Rest das Zellpellet resuspendiert, um diese dann auf einer zweiten Agarplatte auszuplattieren.
9. Die beiden erhaltenen Agarplatten inkubierten über Nacht bei 37 °C.

Variiert wurden bei diesem Verfahren sowohl die genutzten DNA-Mengen als auch Applikationsdauer des Hitzeschocks. Promega empfiehlt für ihre KRX Zellen eine DNA-Menge von 1-50 ng. Da zu viel DNA die Transformationseffizienz herabsetzen kann, wurden verschiedene DNA-Mengen getestet [72]. Bei einigen Transformationen konnte jedoch erst durch die Steigerung der genutzten DNA auf bis zu 500 ng positive Klone erhalten werden.

2.2.5 Glycerinkulturen von *E. coli* Zellen

Zum Anlegen einer längerfristigen Stammkultur von *E. coli* Zellen diente die Glycerinkultur. Für das Erstellen einer Glycerinkultur wurden zunächst 3 ml einer Vorkultur angeimpft. Die *E. coli* Zellen trugen dabei das gewünschte Plasmid. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator. Diese Vorkultur diente am Folgetag dazu eine neuerliche 30 ml Kultur anzupflanzen. Wiederum erfolgte eine Inkubation bei 37 °C im Schüttelinkubator, bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase. Dies war bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 gegeben. Die endgültige Glycerinkultur konnte durch Vereinigen von 800 µl dieser Zellsuspension mit 200 µl autoklaviertem Glycerin erstellt werden. Nach einer abschließenden Inkubationsphase von 20 min auf Eis erfolgte die dauerhafte Lagerung der Glycerinkultur bei -80 °C.

2.3 Molekularbiologische Methoden

In diesem Abschnitt sollen verschiedenste Methoden zusammengefasst sein, welche das direkte Arbeiten mit verschiedensten DNA-Fragmenten betreffen.

2.3.1 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese war die Methode der Wahl zum Auftrennen von DNA-Fragmenten, korrelierend mit ihrer jeweiligen Größe. Dabei macht man sich die negative Ladung des Phosphatrückgrates der DNA zunutze, denn Moleküle, die eine Nettoladung aufweisen, wandern innerhalb eines elektrischen Feldes. Ein Agarose- oder Polyacrylamidgel bietet dabei die Matrix, um die großmögliche Trennung der einzelnen DNA-Spezies zu erreichen.

2.3.1.1 Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese weist eine ideale Trennschärfe für Fragmentlängen zwischen ca. 0,5 und 30 kb auf. Der ideale Trennbereich variiert dabei mit der Agarosekonzentration der Gelmatrix, die üblicherweise zwischen 0,5 % und 2 % variiert wird.

In dieser Arbeit fanden 1 %-ige Agarosegele Verwendung, um ganze Plasmide oder größere PCR-Fragmente (mehrere Hundert bis Tausend Basenpaare) aufzutrennen. Die Agarose wurde in Elektrophoresepuffer (TBE) in einer Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt, um sie in Lösung zu bringen. Die erhaltene Lösung wurde entweder direkt verwendet oder bis zu ihrer Nutzung bei Raumtemperatur gelagert und erneut geschmolzen. Die verflüssigte Agarose konnte in einen Gelschlitten gegossen und ein Kamm eingesteckt werden. Nach Überführen des ausgehärteten

Gels in eine Elektrophoresekammer mit vorgelegtem Elektrophorespuffer folgte das Ziehen des Kamms. Die eigentliche zu analysierende Probe wurde auf einem Tesastreifen mit 6x Ladepuffer von Fermentas (heute Thermo Fischer) gemischt und das Gemisch in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 5 V pro 1 cm Elektrodenabstand der Elektrophoresekammer. Die Dauer der Elektrophorese betrug meist 60 min und wurde durch die im Ladepuffer enthaltenen Farbmarker optisch kontrolliert. Eine Inkubation des Agarosegels für 10 min in einem Ethidiumbromid-Bad ermöglichte die Visualisierung der DNA mittels der Geldokumentationsanlage GelDoc 2000. Als Alternative zu dem obigen Ladepuffer fand *DNA-Dye NonTox* von AppliChem Verwendung. Dieser Ladepuffer färbte die DNA direkt an, wodurch ein Bad des Gels in Ethidiumbromid obsolet wurde. Das Gel konnte direkt nach dem Lauf visualisiert und digitalisiert werden. Als Größenstandard diente der Marker *Gene Ruler 1 kb DNA Ladder* von Fermentas.

10x TBE-Puffer (pH 8,3)

1 M Tris

1 M Borsäure

25 mM EDTA

2.3.1.2 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sehr hochprozentige Agarose Gele (2,5 %) sind zwar zur Trennung kleiner DNA-Fragmente mit wenigen Hundert Basenpaaren geeignet, sie bieten jedoch nur eine mäßige Trennschärfe und schlechte Visualisierung der DNA. Daher sind hier Gele mit einer Polyacrylamid-Matrix zu bevorzugen, die exzellente Trennschärfen auch bei wenigen Basenpaaren liefern können.

In dieser Arbeit wurden 8 %-ige Acrylamidgele verwendet, um PCR-Fragmente mit ca. 500 bp oder weniger aufzutrennen. Das Polymerisieren des Polyacrylamid-Gelmixes wurde durch Zusatz von je 20 µl 40 %-igem APS und reinem TEMED eingeleitet. Es schloss sich das Gießen dieser Mischung, noch vor dem Erhärten, zwischen zwei Glasplatten an. Das erhärtete Gel konnte in eine vertikale Elektrophoresekammer von BioRad montiert werden. Es folgte das Auftragen der DNA in die Taschen. Auch hier wurde die DNA mit einem Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte für 40-50 min bei 45 mA. Die Detektion der DNA war dem Vorgehen der Agarosegelelektrophorese analog.

8 %-iges Polyacrylamid-Gel

1 ml 10x TBE-Puffer

4 ml Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)

8 %-iges Polyacrylamid-Gel

ad. 10 ml H₂O

2.3.2 Isolation von Plasmid-DNA (Mini-/Midiprep)

Die Methode der Miniprep diente dem routinemäßigen Reinigen kleiner DNA-Mengen im Laufe von Klonierungen und Mutagenesen. Hierfür kam jeweils eines zweier Komplettsysteme zur Anwendung, es sind dies *PureYield™ Plasmid Miniprep System* und *QIAquick® Spin Miniprep Kit*. Bei der Verwendung der jeweiligen Systeme wurde nach den Protokollen der Hersteller verfahren. Die Prozedur schloss mit der photometrischen Konzentrationsbestimmung der DNA, mittels des Spektrophotometers NanoDrop ND-1000.

2.3.3 Polymerasekettenreaktion

Die in den 1980er Jahren von Kary Mullis entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) war ein wahrer Quantensprung der Molekularbiologie [73]. Sie ermöglichte erstmals die schnelle, kosteneffiziente *in vitro* Amplifikation von DNA-Molekülen. Der Schlüssel für eine kontinuierliche Reaktion stellt dabei die Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase dar. Diese ist dazu in der Lage, die Elongation eines DNA-Stranges zu katalysieren, sofern eine DNA-Vorlage (sog. *template*) sowie zwei Primer mit freien 3'-OH-Enden zur Addition weiterer Desoxynukleotide anwesend ist. Die Reaktion erfolgt zyklisch in drei sich wiederholenden Phasen. Es sind dies die Denaturierung zum Schmelzen der Einzelstränge, das Annealing zum Hybridisieren der Primer und letztendlich die Elongation zum Verlängern der DNA-Stränge [74]. Der Elongationsschritt kann von verschiedenen DNA-Polymerasen katalysiert werden, welche sich hinsichtlich ihrer Prozessivität, Katalysationsgeschwindigkeit, Exonukleaseaktivitäten und eines *proofreading* Mechanismus unterscheiden.

2.3.3.1 Standard-PCR

In dieser Arbeit wurde folgender Standardreaktionsansatz für die PCR genutzt:

Komponente	50 µl PCR-Ansatz
<i>template</i> DNA	ca. 100 ng
Senseprimer (3 µM)	5 µl

Komponente	50 µl PCR-Ansatz
Antisenseprimer (3 µM)	5 µl
dNTPs (2 mM pro Nukleotid)	5 µl
Polymerasepuffer (5x oder 10x)	5 oder 10 µl
DNA-Polymerase	1 µl
autoklaviertes Wasser	ad 50 µl

In Abhängigkeit von dem jeweiligen Anwendungszweck kamen verschiedene DNA-Polymerasen zum Einsatz. Am gebräuchlichsten ist die *Taq*-DNA-Polymerase, welche eine 5'→3'-Exonukleaseaktivität aufweist [75]. Ihr fehlt zwar ein *proofreading* Mechanismus, wodurch die Fehlerrate innerhalb der neu synthetisierten DNA höher ist, dafür ist sie jedoch schneller als die *Pfu*-DNA-Polymerase. *Taq* kann ca. 1.000 bp pro Minute addieren, *Pfu* dagegen nur 500 bp [76]. Bei besonders schwierig zu amplifizierenden DNA-Fragmenten kam die VELOCITY DNA-Polymerase des Herstellers Bioline zum Einsatz. Sie zeichnet sich durch eine 3'→5' *proofreading* Exonukleaseaktivität aus ebenso wie *Pfu*. VELOCITY weist, laut dem Hersteller Bioline, außerdem eine enorme Geschwindigkeit auf (1.000 bp in 15 sec). Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen den einzelnen Polymerasen ist durch ihre unterschiedlichen Temperaturoptima gegeben. Für *Taq* und VELOCITY liegt dieses bei 72 °C, für *Pfu* bei 68 °C.

Für Klonierung und Mutagenesen wurde, wenn möglich, *Pfu* herangezogen. Ergaben sich hierbei Schwierigkeiten, wurde auf VELOCITY zurückgegriffen. In einigen Fällen kam hierbei auch *Taq* zur Anwendung, es wurde jedoch eine Polymerase mit *proofreading* Aktivität bevorzugt, sofern mit dem jeweiligen PCR-Produkt weitergearbeitet werden sollte. *Taq* war daher die Polymerase der Wahl, wenn es um einfache Kontrollen und *screening*-PCRs ging.

Temperaturprofil einer Standard-PCR

95 °C	3 min		
95 °C	30 sec	} Wiederholung in 27 Zyklen	Schmelzen
55 °C	30 sec		Annealing
72 °C	1 min		Elongation
72 °C	5 min		
10 °C	ad infinitum		

Es fand eine Anpassung der Elongationstemperaturen und Elongationsdauer an die jeweilige Polymerase statt. Ebenfalls wurde die Länge der *template* DNA berücksichtigt. Die Annealingtemperatur wurde an die genutzten Primer angepasst. Deren Schmelztemperaturen wurden nach der folgenden Faustformel berechnet: $T_M = (G+C) \times 4\text{ °C} + (A+T) \times 2\text{ °C}$. Die

Annealingtemperatur wurde schließlich 5 °C niedriger als die Schmelztemperaturen gewählt.

2.3.3.2 Colony-PCR-screen

Die *colony*-PCR dient zur Identifikation jener Bakterienklonien, welche nach einer Transformation das Plasmid mit einem gewünschten *insert* aufgenommen haben. Bei diesem Verfahren werden ganze Bakterienkolonien (eben eine *colony*) als *template* innerhalb des PCR-Ansatzes verwendet. Für die konkrete Durchführung des *screening* Verfahrens wurde die *Taq*-DNA-Polymerase genutzt, da kein *proofreading* benötigt wurde. Die Wahl der Primer gestaltete sich so, dass ein Primer auf dem *insert* binden sollte und der jeweils andere Primer auf dem Plasmid. Ein korrektes PCR-Produkt entstand daher nur, wenn das gewünschte Plasmid inklusive seines *insert* in den Zellen vorlag. Zum Überführen der Bakterienkolonien diente eine an der Spitze rundgeschmolzene Pasteurpipette. Die PCR erfolgte so wie im Vorherigen beschrieben.

2.3.3.3 Gradienten-PCR

Die adäquate Bindung der PCR-Primer ist unabdingbare Prämisse für das Gelingen einer PCR. Ein kritischer Faktor ist hierbei die gewählte *annealing* Temperatur. Ist diese zu hoch, binden die Primer nicht oder nur unspezifisch. Daher wurden verschiedenste Berechnungsverfahren zur Ermittlung der Schmelztemperatur von PCR-Primern entwickelt und kontinuierlich verfeinert [77][78][79][80]. Ergeben sich trotzdem Schwierigkeiten ein korrektes PCR-Produkt zu erhalten, so kann man die beste *annealing* Temperatur experimentell bestimmen. Hierzu dient die Gradienten-PCR, die in mehreren identischen PCR-Ansätzen, einem Temperaturgradienten folgend, unterschiedliche *annealing* Temperaturen bietet [72].

In dieser Arbeit fand der Mastercycler gradient von Eppendorf Anwendung, um bei schwierigen PCRs, insbesondere die Klonierung der NAD-Kinase betreffend, eine Optimierung der gegebenen PCR-Bedingungen zu erzielen.

2.3.4 Molekulare Klonierung

Die molekulare Klonierung dient dazu, ein DNA-Segment in einen Vektor einzubringen, welcher dann die vielfache Vermehrung dieses Segments, üblicherweise durch *E. coli*, ermöglicht. Darüber hinaus können die so erstellten Plasmidvektoren auch noch dem Zweck dienen, die Expression eines Gens herbeizuführen. Bei der molekularen Klonierung, oder kurz Klonierung, kann man mehrere Einzelabschnitte verzeichnen, es sind dies das Generieren eines *insert*, der Verdau von erstelltem *insert* sowie Plasmidvektor, Ligation beider Fragmente sowie

Transformation eines Bakterienstammes mit dem generierten rekombinanten Plasmid.

2.3.4.1 Erstellen eines *insert* mittels PCR

In dieser Arbeit wurden sämtliche in einen Vektor zu ligierenden DNA-Segmente, die sog. *inserts*, durch PCR erstellt. Sofern eine spezifische Restriktionsschnittstelle an Enden dieser *inserts* erwünscht waren, wurden diese über die verwendeten Klonierungsprimer eingefügt. Die dabei verwendete Primer trugen in diesen Fällen eine passende Restriktionsschnittstelle an ihren 5'-Enden, den sog. *add on*. Eine Ermittlung der nötigen Zahl komplementärer Basenpaare erfolgte über die für die Standard-PCR angegebene Faustformel, so dass eine Schmelztemperatur von 60 – 62 °C erzielt wurde.

2.3.4.2 Verdau von DNA-Molekülen durch Restriktionsendonukleasen

Das Prozedere für die Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme richtete sich im Wesentlichen nach den Angaben des jeweiligen Herstellers. Überwiegend kamen Enzyme von NEB sowie Fermentas (heute Thermo Scientific) zum Einsatz. Die allgemeinen für einen Restriktionsverdau genutzten Bedingung sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen:

Komponente	Fermentas (auch FastDigest)	NEB
DNA	1 µg	1 µg
Enzym	1 µl	1 µl
Puffer (10x)	2 µl	5 µl
Wasser (autoklaviert)	x µl	x µl
Gesamtvolumen	20 µl	50 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	1-2 h	1-2 h

Für Enzyme bei denen keine *star activity* zu befürchten stand, wurde immer ein Überverdau vorgenommen. Dies gilt insbesondere für FastDigest Enzyme von Fermentas, die bis zu einer Stunde inkubierten. Bevorzugte Verwendung fanden FastDigest Enzyme bei einem Doppelverdau. Hier wurde von jedem Enzym 1 µl in den Restriktionsansatz gegeben.

2.3.4.3 Ligation zweier DNA-Fragmente

Die Ligation zweier DNA-Fragmente wurde durch das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert. Die

Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur. Zu Beginn der Ligation wurde dem Ansatz 1 µl der Ligase hinzugefügt. Nach einer Stunde wurde ein weiterer µl hinzugegeben. Alternativ zu diesem Vorgehen erfolgte die Ligation über Nacht bei 4 °C, wobei der jeweilige Ansatz direkt mit 2 µl des Enzyms versetzt wurde. Grundsätzlich handelte es sich dabei um *sticky end* Ligationen. Die Berechnung der nötigen Vektor- und *insert*-Mengen erfolgte durch ein selbst geschriebenes Programm. Von dem Ligationsansatz wurden jeweils 10 µl für eine Transformation verwendet.

Komponente	Volumen/Stoffmenge
verdauter Vektor	30 ng
DNA <i>insert</i>	meist 5-fach molarer Überschuss
10x T4-DNA-Ligase-Puffer	2 µl
T4-DNA-Ligase	2 µl
Wasser (autoklaviert)	x µl
Gesamtvolumen	20 µl
Inkubationstemperatur	RT oder 4 °C
Inkubationszeit	2 h oder ü/N

2.3.4.4 Screening von Bakterienkolonien nach rekombinanten Plasmiden

Das *screening* von Bakterienkolonien, welche nach erfolgreicher Transformation angewachsen waren, erfolgte mittels *colony*-PCR. Dabei wurden einzelne Klone mit einer rundgeschmolzenen Pasteurpipette gepickt und auf einer Agarplatte ausgestrichen, um einen evtl. positiven Klon nicht zu verlieren. Restliche an der Pipette verbliebene Bakterien dienten als *template* in der eigentlichen PCR. Bei Vorhandensein eines PCR-Produktes war der jeweilige Klon als positiv identifiziert und konnte zum Animpfen einer LB-Kultur für eine spätere Miniprep genutzt werden.

2.3.4.5 Auswertung von DNA-Sequenzierungen

Um die Ergebnisse des vorherigen *screening* zu verifizieren, wurden als positiv identifizierte Klone einer abschließenden Sequenzierung unterzogen. So konnte nicht nur die Klonierung selbst überprüft, sondern auch Mutationen ausgeschlossen werden. Die Sequenzierung erfolgte durch „Eurofins MWG Operon“, sofern eine Leseweite von über 1000 bp vonnöten war. Kürzere Sequenzen wurden durch den direkt im IFZ angesiedelten Sequenzierservice untersucht. Eine Prüfung der Qualität der Sequenzierung erfolgte anhand der Chromatogramme unter

Zuhilfenahme des Programms FinchTV. Um mehrere Sequenzdateien miteinander zu vergleichen, wurde mittels ClustalW oder ClustalX ein Alignment erstellt [81]. Zur Darstellung der Alignments wurde das Programm Jalview herangezogen [82].

2.3.5 Mutagenese

Im Laufe dieser Arbeit kam ein Mutageneseverfahren zum Einsatz, das an ein von Kirsch und Joly erarbeitetes Protokoll angelehnt ist [83]. Eine Besonderheit dieses Protokolls besteht darin, dass es das simultane Einbringen mehrerer Mutationen in eine DNA-Sequenz ermöglicht. Dabei findet eine zweiphasige *in vitro* DNA-Synthese mittels PCR statt. In einem ersten Schritt wird dabei ein sog. Megaprimer erstellt. Hierbei handelt es sich um ein kurzes PCR-Fragment zwischen ca. 100 und 500 bp Länge. In den dabei verwendeten PCR-Primern liegt bereits eine Mutation vor. In einem zweiten Schritt dient dieser Megaprimer dann zur vollständigen Amplifikation eines Plasmids in einem anschließenden PCR-Zyklus. Über den Megaprimer werden dabei die Mutationen in das Plasmid integriert.

Zur Durchführung einer Mutagenese wurde zunächst ein Primerpaar entworfen, welches in einer oder mehreren Basenpaaren nicht zur Vorlage komplementär war. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Mutation eine Restriktionsschnittstelle in die Sequenz einfügte (optional kann durch eine stille Mutation auch eine Restriktionsschnittstelle entfernt werden). Flankiert wurde die Mutation jeweils von mindestens zehn komplementären Basenpaaren. Der synthetisierte Megaprimer wurde unter Verwendung des Kits *QIAquick® PCR Purification* gereinigt und in einer zweiten PCR verwendet. Dieser zweite PCR-Ansatz wurde direkt einem DpnI-Verdau unterzogen. Da DpnI nur methylierte DNA schneidet, konnte so das ursprüngliche *template*-Plasmid eliminiert werden. Nach dem Verdau wurde die verbliebene DNA erneut über das bereits zuvor verwendete Kit gereinigt. Es folgte die Transformation von KRX Zellen mit dem so erhaltenen Plasmid. Um auszuschließen, dass doch eine Verschleppung des Ursprungsplasmids erfolgt war, wurde ein weiteres Kontroll-*screening* durchgeführt. Ein mittels colony-PCR generiertes PCR-Produkt sollte den vermeintlich mutierten Sequenzbereich enthalten. Da hier eine Restriktionsschnittstelle eingefügt wurde, konnte das PCR-Fragment durch einen Verdau gespalten werden, sofern die Mutation integriert worden war. Um die Wahrscheinlichkeit einer zusätzlichen zufälligen Mutation zu minimieren kam für die PCR *Pfu* zum Einsatz.

50 µl Reaktionsansatz

template	Ursprungsplasmid	100 ng
Senseprimer		400 nM
Antisenseprimer		400 nM

50 µl Reaktionsansatz

dNTPs		200 µM
Polymerasepuffer	10x <i>Pfu</i> -Puffer	5 µl
DNA-Polymerase	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	1 µl
Wasser (autoklaviert)		<i>ad</i> 50 µl

Temperaturprofil der ersten Mutagenese-PCR

95 °C	3 min		
95 °C	30 sec	} Wiederholung in 27 Zyklen	Schmelzen
55 °C	1 min		Annealing
68 °C	1 min		Elongation
68 °C	5 min		
10 °C	<i>ad infinitum</i>		

50 µl Reaktionsansatz

template	Ursprungsplasmid	100 ng
Megaprimer		50 nM
dNTPs		400 µM
Polymerasepuffer	10x <i>Pfu</i> -Puffer	5 µl
DNA-Polymerase	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	1 µl
Wasser (autoklaviert)		<i>ad</i> 50 µl

Temperaturprofil der zweiten Mutagenese-PCR

95 °C	4 min		
95 °C	50 sec	} Wiederholung in 20 Zyklen	Schmelzen
60 °C	50 sec		Annealing
68 °C	18 min		Elongation
68 °C	7 min		
10 °C	<i>ad infinitum</i>		

2.3.6 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

DNA-Konzentrationen wurden routinemäßig über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Entscheidend für die Absorptionseigenschaften der DNA

sind dabei deren aromatische Basen. Bei den Messungen wurde jeweils ein Spektrum über den Bereich von 220 nm bis 320 nm aufgenommen. Dies gestattete zugleich auch eine Kontrolle der DNA auf durch das Protokoll verbliebenes Ethanol oder eine Proteinkontamination. Für die Konzentrationsbestimmung wurde das Spektrophotometer NanoDrop ND-1000 herangezogen.

2.4 Genexpression und Reinigung von Proteinen aus *E. coli*

2.4.1 Expressionssysteme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedenste Gene heterolog durch *E. coli* exprimiert. Eine grundlegende Beschreibung der dabei verwendeten Zellstämme und Plasmidvektoren erfolgte bereits in Abschnitt 2.2.1.2 respektive Abschnitt 2.2.2. Die dabei eingesetzten Expressionssysteme sollen hier noch einmal zusammenfassend dargestellt werden. Es handelte sich um ein T5- als auch um ein T7-Expressionssystem. Die Zellen sowie Plasmide müssen hierbei aufeinander abgestimmt sein.

2.4.1.1 T5-Expressionssystem

Der Bakteriophage T5 besitzt mehrere hoch effiziente Promotoren, die durch die endogene *E. coli* RNA-Polymerase erkannt werden [84]. Das T5-Expressionssystem stellt das zu exprimierende Gen unter die Kontrolle eines solchen hoch effizienten T5-Promotors. Dies ist der Fall bei dem Plasmidvektor pQE30. Um eine konstitutive Transkription des nachgeschalteten Gens zu unterminieren, ist ein Operator vonnöten. Bei dem pQE30 handelt es sich hierbei sogar um zwei aufeinander folgende Lac-Operatoren. Eine *leaky* Expression soll so weitestgehend minimiert werden. Da der T5-Promotor durch die *E. coli* eigene RNA-Polymerase erkannt wird, kann prinzipiell jeder Expressionsstamm genutzt werden. In dieser Arbeit waren dies jedoch M15-Zellen. Die Induktion der Expression erfolgt durch IPTG (Endkonzentration 1 mM).

2.4.1.2 T7-Expressionssystem

Bei dem T7-Expressionssystem ist dem zu exprimierenden Gen ein T7-Promotor vorangestellt. Auch hierbei handelt es sich um den Promotor eines Phagen (T7-Phage). Dieser Promotor kann im Gegensatz zu dem T5-Promotor jedoch nicht durch die endogene *E. coli* RNA-Polymerase erkannt werden. Hier ist die T7-RNA-Polymerase vonnöten. Sie muss von dem jeweiligen Expressionsstamm verfügbar gemacht werden. Bei BL21(DE3) und KRX Zellen ist dieser Fall gegeben. Um eine gezielte Überexpression zu ermöglichen, darf die T7-RNA-Polymerase nicht

konstitutiv synthetisiert werden. Daher unterliegt sie selbst der Kontrolle eines Operators. Bei KRX Zellen ist dies der Rhamnosepromotor *rhaP_{BAD}* und bei BL21(DE3) der durch IPTG induzierbare Promotor *lacUV5*. Prinzipiell kann bei diesem System also eine doppelte Expressionskontrolle nutzbar gemacht werden, jeweils durch einen Operator für die T7-RNA-Polymerase und einen für das eigentliche Zielgen. Bevorzugt verwendet wurde eine Kombination aus KRX Zellen und pET28a-Plasmid. Dabei zeigte sich, dass es hinreichend war, die Expression des T7-RNA-Polymerasegens durch Rhamnose zu induzieren (Endkonzentration 0,1 %). Eine zusätzliche Induktion mit IPTG, um den Lac-Operator des Plasmids freizugeben, erzielte keine nennenswert gesteigerte Proteinausbeute.

2.4.2 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Um dem hohen Proteinbedarf, insbesondere bei der Proteinkristallisation nachzukommen, wurden meistens sechs 1 l Flüssigkulturen parallel angezüchtet. Zum Animpfen dieser Kulturen dienten jeweils 50 ml einer Vorkultur, welche bereits am Abend des Vortages erstellt worden waren. Dabei gewährleistete ein Antibiotikum in jedem Medium die Selektion des jeweiligen Bakterienstammes. Die angeimpften Hauptkulturen inkubierten in einem temperaturregulierten Luftschtüttler bei 37 °C. Eine Observation des Zellwachstums erfolgte durch photometrisches Bestimmung der Zelldichte. Die Expression des Zielgens wurde bei Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 durch Zugabe von IPTG respektive Rhamnose induziert. Die eigentliche Expressionsphase erfolgte für die meisten Proteine bei Raumtemperatur, in einem einfachen Luftschtüttler ohne Temperaturkontrolle, über Nacht. Alternativ dazu erfolgte auch die Überexpression bei 37 °C. Dann jedoch, bedingt durch das gesteigerte Wachstum, jedoch nur für ca. 4-5 Stunden, bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 1,5 und 1,7. Es folgte die Zellernte. Hierzu wurde jeweils 1 l einer Kultur bei 4000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert (Sorvall RC 6+ Zentrifuge und F9S-4x1000y Rotor). Der Überstand wurde jeweils verworfen und erneut 1 l der Bakterienkultur hinzugegeben. Durch einen zweiten Zentrifugationsschritt konnte die Ausbeute gesteigert werden. Die Zentrifugenbecher wurden bei den nachfolgenden Arbeitsschritten stets auf Eis gekühlt. Die Zellpellets wurden mit jeweils 30 bis 40 ml eines Protein-spezifischen Puffers versetzt. Mittels eines Spatels konnten die Pellets gelöst und partiell zerkleinert werden. Die so erhaltene Suspension wurde in 50 ml Greinergefäße überführt und durch Vortexen weiter homogenisiert. Um das Degradieren von Proteinen weitestgehend zu unterbinden, auch im Hinblick auf den späteren Zellaufschluss, erfolgte noch die Zugabe der beiden Proteaseinhibitoren Cystatin (40 nM) sowie Pepstatin (150 nM). Die so erhaltene fertige Zellsuspension wurde bei -20 °C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

Die genauen Expressionsbedingungen der einzelnen Proteine sind in der nachfolgenden Tabelle

aufgelistet. Teilweise wurden verschiedene Expressionsbedingungen getestet.

Protein	Vektor	<i>E.coli</i>-Stamm	Induktion	Medium	Temperatur
NaMNAT	pET28a	KRX	Rhamnose	LB	37 °C → RT
NaMNAT Cystein-Mutanten	pET28a	KRX	Rhamnose	LB	37 °C → RT
NaPRT	pRSET A	BL21(DE3)	IPTG	2xYT	37 °C → RT
	pQE30	M15	IPTG	2xYT	37 °C → RT
	pET28a	KRX	Rhamnose	LB	37 °C → RT
Plrx	pQE30	M15	IPTG	LB	37 °C

NaMNAT-Lagerungspuffer	NaPRT-Lagerungspuffer	Plrx-Lagerungspuffer
30 mM Tris/HCl pH 8,0	50 mM Tris/HCl pH 7,7	50 mM Tris/HCl pH 8,0
250 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
10 % Glycerin		

2.4.3 Reinigung von Proteinen aus *E. coli*

Die in einem Greinergefäß eingefrorene Zellsuspension wurde zunächst in einem warmen Wasserbad aufgetaut. Die eigentliche Lyse der Bakterien erfolgte in einem zweistufigen Verfahren. In einem ersten Schritt erfolgte der enzymatische Zellaufschluss mittels Lysozym. Hierzu wurde die flüssige Bakterienlösung in ein Becherglas überführt und mit je einer Spatelspitze Lysozym sowie DNaseI versetzt. Diese Suspension wurde dann für 30 bis 60 min in einem eisgekühlten Wasserbad gerührt und anschließend in ein Zentrifugationsgefäß überführt. Es schloss sich ein zweiter Lyseschritt mittels Ultraschall an, wobei eine Ultraschallsonde in die Zellsuspension eingetaucht und viermal ein hochfrequenter Schallimpuls (75 % Intensität, 50 % Intervall) für jeweils 30 sec gegeben wurde. In dem so erhaltenen Homogenisat erfolgte eine Trennung von löslichen und unlöslichen Zellbestandteilen mittels Zentrifugation für 30 min bei 18.000 rpm und 4 °C (Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SS-34 Rotor). Für das weitere Vorgehen wurde nur der Überstand benötigt und das Pellet verworfen.

Die selektive Extraktion des Zielproteins erfolgte über Metallchelatchromatographie (*immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC). Im Verlauf der Klonierungen war jedes Protein mit einem N- oder C-terminalen Hexa-Histidin-Tag (His₆-Tag) versehen worden. Zur Reinigung der Proteine kamen zwei verschiedene Matrixmaterialien zum Einsatz, Ni-NTA Agarose (*nitrilotriacetic acid*) sowie TALON Granulat. Bei beiden Materialien handelt es sich um tetravalente Metallchelatoren, wobei Ni-NTA, wie der Name schon impliziert, ein Nickelion

gebunden hat, TALON dagegen ein Cobaltion.

Für die Reinigung selbst wurden meist 1 ml selten 1,5 ml der Matrix in eine Glasfritte vorgelegt und mit dem jeweiligen Protein-Lagerungspuffer äquilibriert. Hieran schloss sich der Auftrag der flüssigen Fraktion des Zellaufschlusses an. Ein Waschschriff ebenfalls mit dem Protein-Lagerungspuffer sollte unspezifisch auf der Matrix verbliebene Proteine entfernen. Für die Reinigung von NaMNAT erfolgte an dieser Stelle eine Umpufferung. Dazu wurde ein weiterer Waschschriff mit dem neuen Puffer durchgeführt. Die Elution der Proteine erfolgte durch sukzessiv ansteigende Imidazolkonzentration. So konnten mehrere Fraktionen des Proteins erhalten werden. Deren jeweilige Reinheit wurde durch eine SDS-PAGE evaluiert. Die Eluate der meisten Proteine wurden hier mit 1,5 mM des Reduktionsmittels TCEP versetzt. Die Fraktionen mit einer hinreichenden Reinheit wurden schließlich in einem Zentrifugalkonzentrator vereinigt und konzentriert. Um verbliebenes Imidazol zu entfernen, schlossen sich weitere Waschschriffe mittels Zentrifugalkonzentration an. Sofern für die Proteinstabilität nötig, wurden die dabei genutzten Puffer ebenfalls mit 1,5 mM TCEP versetzt.

NaMNAT-Kristallisationspuffer	NaMNAT-Kinetikpuffer
50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 später 7,8	50 mM Tris/HCl pH 7,8
150 mM NaCl	150 mM NaCl
	100 mM Arginin
	100 mM Glutamat
	1 % Glycerin
	+ 1,5 mM TCEP

2.4.4 Analytische SDS-PAGE

Die Gelelektrophorese wurde bereits als Methode der Wahl zur Trennung von DNA-Gemischen beschrieben. Aber auch Proteine in einer heterogenen Suspension können gelelektrophoretisch voneinander separiert werden. Das Detergenz SDS (*sodium-dodecylsulfate*, Natriumdodecylsulfat) verleiht den Proteinen dabei nicht nur eine negative Eigenladung, sondern wirkt auch denaturierend. Die Reduktion von Disulfiden mittels DTT oder 2-Mercaptoethanol führt zu dem vollständigen Entfalten der Proteine. Als Matrix zur Trennung eines Proteingemisches dient letztlich eine Polyacrylamidmatrix [85]. Man spricht daher von einer SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese).

Zum Gießen der Gele wurden zwei Glasplatten (Bio-Rad) herangezogen. Zunächst wurde das Trenngel (12 oder 15 % Polyacrylamid) gegossen und mit Ethanol überschichtet. Nach dessen

Auspolymerisieren erfolgte das Gießen des Sammelgels (4 % Polyacrylamid). Das Polymerisieren wurde jeweils durch APS (20 µl 40 %-ige Lsg. auf 10 ml) und TEMED (20 µl auf 10 ml) hervorgerufen. Die fertigen Gele wurden entweder direkt verwendet oder bis zu ihrer Nutzung bei 4 °C in einem Elektrophoresepuffer-getränkten Tuch gelagert, jedoch nicht länger als vier Wochen. Die Stocklösungen zum Erstellen der Gele wurden ebenfalls bei 4 °C gelagert.

Vor der eigentlichen Elektrophorese wurden die Proteinproben mit Probenpuffer versetzt und durch Erhitzen bei 95 °C für ca. 7 min denaturiert. Die so vorbereiteten Proben konnten unter Verwendung einer Spritze aufgetragen werden. Die Trennung erfolgte für ca. 45 min bei 200 V. Nach dem Gellauf wurden die Gele dreimal in Wasser gewaschen und hierfür in einer Mikrowelle erhitzt. Die gewaschenen Gele wurden zum Anfärben der Proteine mit einer *Coomassie Brilliant Blue* Lösung überschichtet und ebenfalls kurz in einer Mikrowelle erhitzt. Die eigentliche Färbung erfolgte für ca. 15 min auf einem Schüttelinkubator. Unspezifisch in das Gel eingelagerter Farbstoff wurde durch mehrmaliges Waschen mit Wasser, wie schon zuvor, entfernt. Bei ungenügender Entfärbung erfolgte ein zusätzlicher Waschschrift mit einer Entfärbelösung. Ein Entsorgungsbeutel von Roth diente den fertig präparierten Gelen als Umschlag. Hierin eingeschlagen wurde es mit einem Flachbettscanner digitalisiert. Als Molekulargewichtsstandard diente meistens *RageRuler Prestained Protein Ladder*.

Trenngel	Sammelgel
12 % oder 15 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	4 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
0,1 % SDS	0,1 % SDS
375 mM Tris/HCl pH 8,8	125 mM Tris/HCl pH 6,8

Lämmli-Probenpuffer	4x Lämmli-SDS-Elektrophoresepuffer
62,5 mM Tris/HCl pH 6,8	100 mM Tris
25 % Glycerin	760 mM Glycin
2 % SDS	0,4 % SDS
350 mM DTT	
0,01 % Bromphenolblau	

Coomassie Brilliant Blue Färbelösung	Coomassie Entfärbelösung
160 mg Coomassie Brilliant Blue R250	8 % Ethanol
ad 1 l H ₂ O	10 % Essigsäure
2 h rühren & filtrieren	
+ 3 ml konz. HCl	

2.4.5 Western Blot

Die SDS-PAGE ist eine Methode, die routinemäßig zur Trennung und zum Nachweis von Proteinen genutzt wird. Eine weitaus sensitivere Methode zum spezifischen Nachweis einzelner Proteine ist der Western Blot. Proteine werden dabei zunächst über eine SDS-PAGE getrennt und schließlich auf eine Membran übertragen und dort immobilisiert [86][87][88]. Anschließend erfolgt ein immunologischer Nachweis des Zielproteins.

In dieser Arbeit wurde ein *semidry* Verfahren zum Blotting der Proteine genutzt. Hierfür wurden 10 Filterpapiere der Größe 6,5 x 9 cm zugeschnitten. Diese mussten jeweils für ca. 10 min in verschiedenen Puffer eingelegt werden: 3 Filterpapiere in Anodenpuffer I, 2 in Anodenpuffer II und 5 in Kathodenpuffer. Eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-Membran) diente dem eigentlichen Transfer. Diese musste zuvor für 1 min in Methanol aktiviert werden. Danach wurde sie ebenfalls in Anodenpuffer II inkubiert. Das SDS-Gel selbst wurde in Kathodenpuffer inkubiert. Schließlich erfolgte der Aufbau der Blotordnung in einem Sandwich mit folgender Zusammensetzung:

- Kathode
- 5 Filterpapiere aus Kathodenpuffer
- SDS-Gel aus Kathodenpuffer
- PVDF-Membran aus Anodenpuffer II
- 2 Filterpapiere aus Anodenpuffer II
- 3 Filterpapiere aus Anodenpuffer I
- Anode

Um einen blasenfreien Aufbau zu gewährleisten, wurde dieser mit einem Glasstab unter leichtem Druck überrollt. Der eigentliche Blotting-Vorgang erfolgte für 30 min bei einer Spannung von 13 V. Ein erster Nachweis des Transfers der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte mit einer Ponceau-S-Lösung und Hervorhebung der gebundenen Proteine mit 1-%iger Essigsäure. Dreimaliges Waschen mit TBS, ließ die Färbung wieder verschwinden. Noch verbliebene Bindungskapazitäten der Membran wurden mittels einer Lösung aus 5-%igem Milchpulver und TBST blockiert. Dieser Waschschrift erfolgte für 1 h bei RT über Nacht bei 4 °C.

Es schloss sich der eigentliche immunochemische Nachweis der Proteine an. Die Membran wurde dreimal für 5 min in TBST gewaschen, schließlich mit einer ersten Antikörperlösung überschichtet und für 1 h unter Schütteln inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit TBST wie zuvor. Nun wurde die Membran mit einer zweiten Antikörperlösung für 1 h inkubiert. Evtl.

unspezifisch verbliebene Reste des Antikörpers wurden durch einen letzten Waschschrift entfernt. Nun folgte die Chemolumineszenz-Detektion des Proteins. Eine Mischung von 1 ml Luminol und 10 µl Cumarinsäure wurde frisch zubereitet und auf die Membran gegeben, um dort für 1 min einzuwirken. Die Membran wurde in eine Klarsichtfolie verpackt und mit ihr ein Röntgenfilm belichtet. Die nötige Belichtungsdauer wurde jeweils bedarfsgerecht angepasst.

Puffer und Reagenzien für den Western Blot

Anodenpuffer I	300 mM Tris
Anodenpuffer II	25 mM Tris
Kathodenpuffer	40 mM 6-Aminohexansäure (nur 3-4 Wochen haltbar)
TBS	10 mM Tris/HCl pH 7,4, 0,9 % NaCl
TBST	TBS + 0,05 % Tween 20
Essigsäure	1 %
Ponceau-S-Stocklg. (10x)	2 % Ponceau S, 3 % TCA
Luminol	1,25 mM Luminol, 0,0093 % H ₂ O ₂ , 0,1 M Tris/HCl pH 8,6 (nur 4 Wochen haltbar, bei 4 °C gelagert)
Cumarinsäure	0,11 % in DMSO

2.5 Fast Protein Liquid Chromatography zur Proteinreinigung

Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ist eine auf die Zwecke der Präparation und Analyse von Proteinen zugeschnittene Chromatographieart [89]. In dieser Arbeit wurde dabei ausschließlich die Variante der Gelfiltration, auch Größenausschlusschromatographie genannt, herangezogen. Eine Gelmatrix fungiert dabei als Molekularsieb und trennt den Analyt in Abhängigkeit von der Molekulargröße auf. Präparativ wurde die Gelfiltration insbesondere dazu herangezogen, die Reinheit von Proteinen für die nachfolgende Proteinkristallisation zu steigern. Aber auch für Analysezwecke wurde sie herangezogen. Hierbei sollte sie den Dimerisierungsstatus von Proteinen aufzeigen.

Für die Trennung aller Proteine wurde eine HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 Gelfiltrationssäule verwendet. Sämtliche für die Gelfiltration verwendeten Puffer und Lösungen wurden sterilfiltriert und anschließend in einem Ultraschallbad entgast. Die Säule wurde mit dem jeweiligen Pufferpuffer, mit 1,5 Säulenvolumina, äquilibriert. Die zu reinigende oder analysierende Proteinlösung wurde auf ein Volumen nicht größer als 1 ml eingengt, Schwebstoffe mittels Zentrifugation pelletiert und nur der Überstand in die Probenschleife (2 ml Gesamtvolumen) injiziert. Es schloss sich die Gelfiltration selbst an, mit Flußraten zwischen 0,6

und 1 ml/min. Dabei wurden Fraktionen zu je 2 ml Volumen gesammelt. Die Elution der Proteine wurde photometrisch observiert mit einer UV-Messung bei 280 nm und hiermit ein Chromatogramm aufgezeichnet. Im Anschluss an die Gelfiltration wurde die Säule mit weiteren 1,5 Säulenvolumina Proteinpuffer gewaschen, um verbliebene Proteinrückstände zu entfernen. Die Säule wurde in 20 % Ethanol gelagert.

Anhand des Chromatogramms konnten diejenigen Fraktionen identifiziert werden, welche das Zielprotein enthielten. Sofern dies für weitere Arbeitsschritte mit dem jeweilige Protein notwendig war, wurden alle potentiell reinen Fraktionen mit 1,5 mM TCEP versetzt. Eine Probe jeder Fraktion wurde für eine SDS-PAGE herangezogen. Somit konnte die Reinheit der jeweiligen Fraktion bestimmt werden. Die besten Fraktionen wurden jeweils in einem Zentrifugalkonzentrator vereinigt und konzentriert. Die so erhaltene hoch reine Proteinprobe wurde schließlich für die Proteinkristallisation herangezogen. Die Wartung der Säule erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend (*GE Healthcare Handbook – Gelfiltration Principles and Methods*).

2.6 Charakterisierung von Proteinen

2.6.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Quantifizierung von Proteinen wurde der sog. Bradford-Test herangezogen. Dieses Verfahren beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine. Die Bindung des Farbstoffes an ein Protein ruft eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 zu 595 nm hervor [90]. Es ergibt sich eine Farbverschiebung von rot-bräunlich zu blau. Bradford selbst gibt eine Stabilität der Färbung zwischen 2 min und 1 h an. Ein Nachteil des Bradford-Assays besteht darin, dass der Farbstoff eine Präferenz für einzelne Aminosäuren zeigt. Am stärksten werden Arginin, Histidin, Lysin und die drei aromatischen Aminosäuren davon angefärbt [91]. Die Farbintensität wird somit entscheidend durch die Aminosäurezusammensetzung des jeweiligen Proteins mit beeinflusst. Bei dem gleichen Protein ermöglicht der Bradfordtest es jedoch, Konzentrationen miteinander exakt zu vergleichen und gegebenenfalls immer die gleiche Konzentration einzustellen.

Zur Auswertung der Messergebnisse wurde zunächst eine Standardreihe mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt, es sind dies 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15 sowie 20 µg/ml BSA in Wasser gelöst. Von diesen Lösungen wurden jeweils 500 µl mit 125 µl Bradfordreagenz (Hersteller Bio-Rad) versetzt und vermischt. Die eigentliche Messung erfolgte nach einer Inkubationsphase von 5 bis 15 min. Im Rahmen der Messungenauigkeit wurden hierbei identische Werte erhalten.

Für die eigentliche Messung wurde in einer analogen Weise verfahren. Nach einer Vorverdünnung der Proteinlösung wurden davon 5 µl mit 495 µl Wasser vermischt und mit 125 µl Bradfordreagenz versetzt. Die Messung erfolgte jeweils nach ca. 5 min. Die Messungen wurden zumindest durch eine Doppelbestimmung abgesichert.

Eine Alternative zu dieser Methode stellt die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm dar. Hauptsächlich verantwortlich für die Absorption von ultraviolettem Licht sind die aromatischen Aminosäure Tryptophan und Tyrosin. Die Konzentration einer Proteinlösung kann dann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden:

$$E = \varepsilon * c * d \Rightarrow c = \frac{E}{\varepsilon * d}$$

E = Extinktion

ε = molarer Extinktionskoeffizient [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

d = Distanz durch die Probenlösung [cm]

c = Konzentration der gemessenen Probe [μM]

Der molare Extinktionskoeffizient kann mit Hilfe des folgenden Algorithmus bestimmt werden:

$$\varepsilon_{\text{Protein}} = n * \text{Trp} * 5500 + n * \text{Tyr} * 1490 + n_{\text{Cys-S-S-Cys}} * 125 [M^{-1} * \text{cm}^{-1}]$$

n = Anzahl

Tyr = Tyrosin

Trp = Tryptophan

Cys-S-S-Cys = Disulfidbrücken

2.6.2 Kinetische Charakterisierung von Proteinen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Proteine kinetisch charakterisiert werden. Über eine Michaelis-Menten-Kinetik sollten K_M und V_{\max} -Werte der einzelnen Substrate ermittelt werden. Dies sollte auch dazu dienen, die Substratpräferenzen einzelner Enzyme zu untersuchen. Für die jeweiligen Proteine wurden verschiedene Assays etabliert.

2.6.2.1 Kolorimetrischer Phosphatnachweis

Viele der an dem NAD-Syntheseweg beteiligten Enzyme setzen Pyrophosphat (PP_i) frei. Dieses sollte nach einer Hydrolyse zu Orthophosphat (P_i), über eine Pyrophosphatase, detektiert werden. Da Ortho- als auch Pyrophosphat an einer Vielzahl biochemischer Reaktionen beteiligt sind, wurden hierfür verschiedene Nachweisverfahren entwickelt, welche auf der Bildung eines Phosphomolybdatkomplexes beruhen [92]. Hier sollte ein Assay zur Anwendung kommen, welcher auf der Reduktion eines Phosphomolybdatkomplexes durch Ascorbinsäure beruht [93]. Die Autoren bescheinigen ihrem Assay eine erhöhte Farbentwicklung, Linearität und Sensitivität, auch in Gegenwart von 10 mM ATP, weshalb dieser Assay hier genutzt werden sollte.

Für den eigentlichen Phosphatnachweis wurden 15 µl einer Phosphat-haltigen Lösung (z.B. Reaktionsansatz oder Phosphatlösung für Standardkurve) mit 45 µl der Färbelösung (Lösung E) in einer Mikrotiterplatte (*half area*) vermischt. Das Gemisch inkubierte bei Raumtemperatur für 5 min, wobei sich der eigentliche farbige Phosphomolybdatkomplex bildete. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von ebenfalls 45 µl der Stop-Lösung (Lösung F) abgebrochen. Die eigentliche Messung erfolgte nach weiteren 15 min photometrisch bei einer Wellenlänge von 655 nm in dem Plattenspektrophotometer Infinite M200.

Lsg. A:	Lsg. C:	Lsg. E: Färbelsg.	Lsg F: Stoplsg.
12 % Ascorbinsäure	10 % Ammoniummolybdat	1/3 Lsg. A	2 % Trinatriumcitrat Dihydrat
1 M HCl		2/3 Lsg. C	2 % Essigsäure
ddH ₂ O phosphatfrei (!) für sämtliche Lösungen			

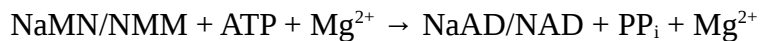
2.6.2.2 Kolorimetrischer Phosphatnachweis mittels Malachitgrün

Als Alternative zu dem zuvor beschriebenen Phosphatnachweisverfahren wurde eine auf Malachitgrün basierende Methode herangezogen. Auch bei diesem Verfahren bildet sich ein Phosphomolybdatkomplex [92]. Gemäß den Herstellerangaben (*ProFoldin MicroMolar Phosphate Assay Kit*) ist damit eine Detektion im Konzentrationsbereich zwischen 0,2 µM und 20 µM P_i möglich. Dabei sollen 1 Volumenteil der Phosphatlösung mit 1,5 Volumenanteilen der Färbelösung gemischt werden. Um ein geringeres Probenvolumen nutzen zu können, wurde dieses Vorgehen adaptiert und die Färbelösung mit Wasser verdünnt. Es ergaben sich folgende Volumina: 7 µl Probe + 63 µl ddH₂O + 105 µl Färbelösung. Die Messung selbst gestaltete sich nun denkbar einfach. 7 µl der zumessenden Probe wurden mit 168 µl der Färbelösung versetzt. Diese Mischung inkubierte für 5 min bei 25 °C, um Zeit für die Bildung des Farbkomplexes zur Verfügung zu stellen. Darauf wurde direkt mit dem Plattenphotometer bei 655 nm gemessen. Da auch die Phosphatstandardkurve in einem analogen Vorgehen erstellt wurde, entfiel die Notwendigkeit eines Umrechnungsschrittes zur späteren Konzentrationsberechnung der Analytlösung.

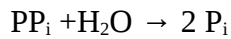
2.6.2.3 NaMNAT Enzymassays für den Phosphatnachweis

Für die kinetische Untersuchung von NaMNAT wurde ein diskontinuierlicher Assay verwendet, welcher die Produktion von Pyrophosphat an die kolorimetrische Detektion von Orthophosphat koppelt. Dabei lassen sich zwei Zwischenschritte verzeichnen:

(1) durch NaMNAT katalysierte Adenylyltransferasereaktion:



(2) Hydrolyse des PP_i durch eine anorganische Pyrophosphatase (PPase)



Das in diesem Assaysystem gebildete Orthophosphat wurde schließlich über eines der zuvor beschriebenen Nachweisverfahren detektiert. Ein deutlicher Überschuss der Pyrophosphatase sollte hierbei garantieren, dass die im ersten Schritt ablaufende, durch NaMNAT katalysierte, Reaktion tatsächlich limitierend ist. Es wurden sowohl Aktivitätstests als auch Kinetiken mit diesem Verfahren und anschließender Phosphatdetektion gemessen. Für die Messung von Kinetiken kamen verschiedene Substratkonzentrationen zum Einsatz. Diese wurden sukzessive für jedes Enzym so optimiert, dass schließlich eine Sättigung bei hohen Substratkonzentrationen zu verzeichnen war. Um eine, bei der anschließenden Farbreaktion, auftretende Hintergrundfärbung beurteilen und ausgleichen zu können, wurde jeweils ein Kontrollansatz erstellt, welcher dem eigentlichen Reaktionsansatz analog war, jedoch kein NaMNAT enthielt. Es wurden Mastermixe erstellt und diese in einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Durch Zusatz eines der beiden Substrate wurde die jeweilige Reaktion gestartet. Nur die Aktivitätstests wurden durch Zusatz von NaMNAT gestartet. Die Reaktionen erfolgten bei einer Temperatur von 25 ± 1 °C. Die Zusammensetzung der einzelnen Enzymassays ist in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet.

Bestandteil	K_M ATP	K_M NaMN	K_M NMN	Aktivitätstest
NaMNAT	jeweils konstant	jeweils konstant	jeweils konstant	variabel
PPase	3 U/ml	3 U/ml	3 U/ml	3 U/ml
NaMN	1 mM	variabel	–	1 mM
NMN	–	–	variabel	–
ATP	variabel	3,5 mM	3,5 mM	5 mM
MgCl ₂	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
Assaypuffer	1x	1x	1x	1x
H ₂ O	zur Volumen Anpassung			
Assaypuffer 2x	200 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM NaCl			
PPase-Puffer	20 mM Tris pH 8,0, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 50 % Glycerin			

2.6.2.4 Einstellung von Substratkonzentrationen

Wann immer es möglich war, wurden die Konzentrationen, der in den Assays genutzten Substrate, photometrisch kontrolliert. Dies gilt für ATP, NaMN sowie NMN. Für ATP wurde der folgende molare Extinktionskoeffizient genutzt: $15.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 259 nm. Ebenso konnte ein Extinktionskoeffizient für NMN in der Literatur gefunden werden, er beträgt $4.740 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 259 nm [57]. Da die Dinukleotidvarianten beider Moleküle einen identischen Extinktionskoeffizienten aufweisen (siehe die jeweilige „ProductInformation“ von Sigma, E^{mM} (260 nm) = 18,0 (0,1 M Phosphat, pH 7,0)) wurde darauf geschlossen, dass auch die Mononukleotide identische Extinktionskoeffizienten aufweisen müssen. Somit wurde auch für NaMN die Konzentration mit einem Extinktionskoeffizienten von $4.740 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (259 nm) bestimmt. Von allen drei Substanzen wurden Stocklösungen in Wasser erstellt. Für ATP waren dies 100 mM für NaMN als auch NMN je 40 mM. Diese Stocklösungen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.2.5 Datenauswertung nach Michaelis-Menten

Die Auswertung der Kinetiken erfolgte nach Michaelis-Menten, mittels LibreOffice. Zur Bestimmung von K_M - und V_{max} -Werten wurde hierzu mit dem Tabellenkalkulationsmodul eine nicht lineare Regression berechnet (Methode der kleinsten Quadrate) und so eine Kurvenanpassung an die gegebenen Messwerte vorgenommen. Die Michaelis-Menten-Gleichung bildete dabei die Grundlage der Kurvenanpassung.

$$V_0 = V_{\text{max}} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad \text{Michaelis-Menten-Gleichung}$$

2.7 Strukturbiologische Methoden

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag bei der Strukturbiologie und den Methoden der Röntgenkristallographie. Dabei sollte die Struktur einiger Proteine *de novo* bestimmt werden, im Falle PfGR sollte eine Cokristallisation mit einem Hemmstoff erfolgen. Um dieses Ziel zu erreichen, kamen eine Vielzahl von Kristallisationsverfahren zur Anwendung.

2.7.1 Proteinkristallisation

Für die Strukturbestimmung mittels Röntgenkristallographie ist das Züchten von Proteinkristallen unabdingbare Prämisse. Für die *ab initio* Kristallisation eines Proteins gilt es dabei, die nötigen Kristallisationsbedingungen jeweils aufs Neue experimentell zu bestimmen.

Hierbei kann es sich als nötig erweisen, mehrere Tausend verschiedene Bedingungen zu testen und gegebenenfalls zu optimieren, um einen hinreichend großen und hochwertigen Proteinkristall zu erhalten. Um dieses Ziel zu erreichen, kamen eine Vielzahl verschiedener Kristallisationstechniken zur Anwendung.

2.7.1.1 Proteinkristallisation mittels Dampfdiffusion

Zur Kristallisation von Proteinen wurde vorwiegend das Dampfdiffusionsverfahren verwendet. Diese Methode beruht auf der allmählichen Konzentrationsänderung einer Proteinlösung. Durch ein langsames Ansteigen der Proteinkonzentration soll schließlich die Kristallisation des Proteins initiiert werden. Erzielt wird diese Konzentrationsänderung durch die Diffusion eines Lösungsmitteldampfes zwischen der Proteinlösung und einer Reservoirlösung. Damit es zu dieser Diffusion kommt, muss ein Konzentrationsgefälle zwischen Protein- und Reservoirlösung bestehen. Daher mischt man den Proteintropfen mit einem gleichgroßen Volumen der Reservoirlösung. Dabei enthält die Reservoirlösung verschiedenste Fällungsmittel, sog. Präzipitantien. Es ergibt sich somit ein Konzentrationsgradient zwischen Protein- und Reservoirlösung, welcher sich durch Diffusion ausgleicht, bis ein dynamisches Gleichgewicht erzielt ist. Von der Dampfdiffusion gibt es zwei Varianten, dies sind der *hanging drop* und der *sitting drop*. Beide sind schematisch in Abb. 3.4 gezeigt.

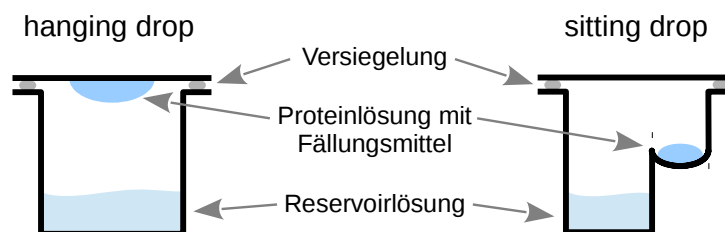


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Proteinkristallisation mittels Dampfdiffusion.

Das Kristallisationsverfahren der Dampfdiffusion gibt es in zwei Varianten, es sind dies *hanging drop* und *sitting drop*. Diffusionsbedingt kommt es dabei zu einem Konzentrationsausgleich zwischen einer Reservoirlösung und einer Proteinlösung. Sind die Bedingungen wie Fällungsmittel und Temperatur dabei angemessen gewählt, kann ein Proteinkristall heranwachsen.

Handansätze im *hanging drop* Verfahren

Das *hanging drop* Verfahren wurde für Handansätze verwendet. In einer 24-well Kristallisationsplatte wurden dazu zunächst verschiedene Fällungsmittel vorgelegt. Das Auftragen eines dünnen Films aus Silikonöl auf den Rand der wells sollte für eine spätere luftdichte Versiegelung sorgen. Nun kamen Deckgläser zum Einsatz, deren Oberfläche zuvor mit

einem Linsenpapier von Verunreinigungen gesäubert worden war. Auf je ein Deckglas wurde ein 2 µl großer Tropfen einer Proteinlösung aufgetragen. Aus einem *well* wurde nun ein ebenfalls 2 µl großer Tropfen des Präzipitans genommen und dem Proteintropfen zugesetzt. Das so präparierte Deckglas konnte nun umgedreht werden und auf das *well* gesetzt werden, dem das Fällungsmittel entnommen worden war. Um einen Luftabschluss zu gewährleisten, wurde das Deckglas noch leicht angedrückt. Als Alternative zu gewöhnlichen Deckgläsern wurden teilweise silikonsierte Deckgläser verwendet. Diese sind teilweise dazu in der Lage, das Auseinanderlaufen der Proteintropfen zu verhindern. Der Tropfen flacht sich weniger ab und behält die Form einer Halbkugel.

Automatisierte Kristallisations-screens im *sitting drop* Verfahren

Die *ab initio* Kristallisation eines Proteins kann es erfordern, mehrere Tausend Kristallisationsbedingungen zu testen. So wurden auch in dieser Arbeit für die Kristallisation verschiedener Proteine weit über 25.000 Kristallisationsansätze erstellt. Für eine Rationalisierung dieser Arbeiten wurde daher auf ein teilweise automatisiertes Verfahren zurückgegriffen. Unter Verwendung des Pipettierroboters Honeybee 961 wurden dabei verschiedenste kommerziell erhältliche sowie selbst erstellte Kristallisations-screens getestet. Die dabei genutzten 96er *well* Kristallisationsplatten sind auf einen *sitting drop* Ansatz ausgelegt. Sie ermöglichten das simultane Testen von 96 Kristallisationsbedingungen mit einem zusätzlichen Kontrollansatz, um Protein- von Salzkristallen unterscheiden zu können. Wurde die Kontrolle ausgelassen, konnten 96 zusätzliche Bedingungen getestet werden, z.B. eine zweite Proteinkonzentration. Die Tropfengröße von Proteinlösung und Fällungsmittel belief sich auf jeweils 200 nl. Nach dem Pipettieren der Ansätze durch den Roboter wurden die Platten mit einer selbstklebenden Klarsichtfolie versiegelt. Es wurden verschiedene Folien getestet und letztlich diejenigen mit der besten Transparenz genutzt. Die so erstellten Kristallisationsplatten wurden in möglichst regelmäßigen Abständen unter einem Stereomikroskop inspiziert.

2.7.1.2 Proteinkristallisation mittels Gegendiffusion

Ein weiteres genutztes Verfahren zur Proteinkristallisation ist die Gegendiffusion (*counter diffusion*). Die Gegendiffusion ermöglicht es, in einer einzigen Glaskapillare einen ganzen Konzentrationsgradienten auf sein Kristallisationspotential zu untersuchen. So kann in einem Experiment ein ganzes Kontinuum von Kristallisationsbedingungen getestet werden. In dem Bereich, der optimale Bedingungen zusammenführt, kann man das Wachstum von Proteinkristallen verzeichnen. Für die Gegendiffusion wurden 10 µl Glaskapillaren genutzt. Diese wurden zunächst, unter Ausnutzung der Kapillarkräfte, zur Hälfte mit einer Proteinlösung befüllt. Dazu wurde die Kapillare mit einem Ende in einen Tropfen der Proteinlösung getaucht.

Schließlich wurde sie mit demselben Ende in Präzipitanslösung getaucht und so vollständig befüllt. Die Enden wurden mit verflüssigtem Wachs versiegelt. Die Kapillare wurde schließlich senkrecht gelagert, so dass sich im Laufe der Zeit ein Konzentrationsgradient zwischen Proteinlösung und Fällungsmittel einstellen konnte. Es erfolgte eine regelmäßige optische Kontrolle mit einem Stereomikroskop.

2.7.1.3 *Seeding* Techniken zur Proteinkristallisation

Das Wachstum eines Kristalls kann man in zwei Phasen unterteilen. Die erste Phase ist die Keimbildung, worauf sich die eigentliche Wachstumsphase anschließt. Die Initiierung der Keimbildung ist einer der Schlüsselprozesse für die Proteinkristalltion. Daher wurden verschiedene Techniken entwickelt, die man als *seeding* bezeichnet, welche das Kristallwachstum von der Keimbildung entkoppeln sollen. Es konnte gezeigt werden, dass mittels *seeding* die Qualität der Kristalle als auch die Zahl möglicher Kristallisationsbedingungen gesteigert werden kann [94][95][96]. Beim *seeding* dienen Mikrokristalle eines Proteins dazu, das Kristallwachstum auch in anderen Bedingungen anzuregen. Dies setzt natürlich das Vorhandensein von Mikrokristalle voraus oder alternativ von Kristallen schlechter Qualität, welche zu Mikrokristallen zerkleinert werden. Darüber hinaus wurden Varianten des Verfahrens mit heterogenen Substanzen erprobt [97], darunter auch Polystyrennanosphären [98].

Erste *seeding* Versuche wurden in Heidelberg am Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung durchgeführt. Hierbei wurde der Kristallisationsroboter Mosquito verwendet. Das Verfahren wurde daraufhin adaptiert und auf den Kristallisationsroboter Honeybee übertragen. Für das *seeding* von NaMNAT wurden zunächst sehr flache NaMNAT-Kristalle in einem Eppendorfcup durch Vortexen mit einem Glaskügelchen zerkleinert und so die nötigen Mikrokristalle erhalten. 300 nl des Fällungsmittels wurden schließlich mit 270 nl der Proteinlösung und 30 nl der *seeding*-Lösung durch einen Kristallisationsroboter vereinigt. Auch hier wurde ein, der obigen Beschreibung analoges, *sitting drop* Verfahren genutzt. Waren keine Mikrokristalle vorhanden, wurden Polystyrennanosphären zum *seeding* herangezogen. Hierbei handelte es sich um 0,05 µm Nanosphären von PolySciences (2,5 %-ige Lösung, 25 mg/ml). Diese Lösung wurde mit dem jeweiligen Proteinpuffer noch einmal um ein Fünfzehntel verdünnt.

2.7.1.4 Additive screen

Für einige Proteine kann es nötig sein, dass sich bestimmte Zusatzstoffe in der Kristallisationslösung befinden. Membranproteine benötigen z.B. Detergenzien, um in Lösung zu bleiben. Diese lagern sich an den hydrophoben membranassoziierten Teil des Proteins an [99] [100]. Aufgrund ihrer Raumforderung können Detergenzien das Kristallgitter jedoch auch stören. Hier können kleine amphiphile Moleküle hilfreich sein [100]. Eine hohe konformationelle Flexibilität eines Proteins kann seine Kristallisation ebenfalls beeinträchtigen. In diesem Fall können strukturstabilisierende Agenzien dazu beitragen, diese strukturelle Heterogenität eines Proteins zu überwinden und so die Proteinkristallisation fördern. Derart positive Effekte konnten z.B. für Glycerin gezeigt werden [101]. Eine gegebene vielversprechende Kristallisationsbedingung kann daher durch das Testen verschiedener Additive so optimiert werden, dass ein Kristall hinreichender Qualität erhalten wird.

Zur Optimierung von Kristallisationsbedingungen wurde ein *additive screen* von Hampton Research verwendet. Wiederum wurde hierfür der Kristallisationsroboter Honeybee herangezogen. Von der zu optimierenden Kristallisationsbedingung wurde zunächst ein 96 *well* Masterblock erstellt. Davon wurden je 90 µl in das Reservoir der Kristallisationsplatten überführt und mit je 10 µl eines Additivs vermischt. Von dieser Mischung wurden 200 nl mit ebenfalls 200 nl der Proteinlösung in einem *sitting drop* vereinigt.

2.7.1.5 Cokristallisation mit Substrat- oder Produktzusatz

1958 beschrieb Koshland die Theorie des *induced fit* [102]. Diese Theorie beschreibt, dass einige Proteine erst durch die Bindung ihres Substrats in eine katalytisch aktive Konformation überführt werden. Eine solche Konformationsänderung kann natürlich auch allgemein für die Bindung eines spezifischen Liganden gelten. Wie dramatisch eine solche Konformationsänderung ausfallen kann, sieht man etwa am Beispiel des Lactoferrin. Die Bindung eines einzigen Eisenions führt hier die Rotation einer N-terminalen Domäne um 53° herbei [103]. Die Bindung eines Substrates kann daher die Kristallisation eines Proteins ganz entscheidend beeinflussen. Flexible Bereiche können etwa stabilisiert werden oder das Protein in eine für die Kristallisation günstigere Konformation überführt werden. Generell sind dabei nicht hydrolysierbare Analoga den eigentlichen Substraten gegenüber zu bevorzugen. Für Substrate ist ein vielfacher Überschuss über K_M -Konzentrationen zu empfehlen. Allgemein gilt für Liganden, dass ein 10-facher molarer Überschuss von Vorteil ist, mindestens jedoch ein 1,5- bis 2-facher Überschuss verwendet werden sollte [104].

Die Kristallisation von PfNaMNAT wurde ausgehend von obigen Überlegungen daher auch als Cokristallisation mit Substrat- oder Produktzusatz durchgeführt. Darüber hinaus wurden auch

verschiedene ATP-Analoga (von Jena Bioscience) getestet. Derartige Versuche wurden sowohl in Handansätzen durchgeführt als auch in umfangreichen *screens* mittels eines Kristallisationsroboters. 10 mg/ml NaMNAT (ca. 0,4 mM) wurden dabei mit 4 mM des jeweiligen Liganden respektive Substrates versetzt. Auch für andere NaMNAT-Konzentrationen wurde ein 10-fach molarer Ligandenüberschuss verwendet. NaMNAT wurde direkt mit den jeweiligen Substanzen vermischt und dieses Gemisch für die zuvor beschriebenen Kristallisationsansätze herangezogen.

2.7.2 Röntgenkristallographische Datenerfassung

Die weitere Analyse erfolgreich herangezüchtete Proteinkristalle erfolgte in Heidelberg am Max-Planck-Institut (MPI) für Medizinische Forschung. Dort mussten die Kristalle in einen Cryopuffer überführt werden. Dieser Puffer entsprach im Wesentlichen dem jeweiligen Kristallisationspuffer, er enthielt jedoch als zusätzlichen Gefrierschutz (*cryoprotectant*) 30 – 35 % Glycerin oder Ethylenglycol. War bereits in dem Kristallisationspuffer eine hinreichende Menge Glycerin oder Polyethylenglycol (PEG) enthalten, so konnten die Menge des zusätzlichen Gefrierschutzes reduziert werden. Die Kristalle wurden mit einem *cryoloop* aus ihrer Kristallisationslösung entnommen, in Cryopuffer überführt und schließlich eingefroren. Das Einfrieren erfolgte in flüssigem Stickstoff (-196 °C), worin die Kristalle auch gelagert wurden. Einmal eingefroren, wurde die Kühltaste auch bei anschließender Untersuchung nicht mehr unterbrochen. Eine erste Untersuchung der Kristalle wurde direkt am MPI für Medizinische Forschung vorgenommen. Hierüber sollte ihre Qualität, d.h. ihr Streuvermögen eruiert werden. Am Wichtigsten war hierbei auszuschließen, dass es sich bei dem vermeintlichen Proteinkristall nicht um einen Salzkristall handelte. Zur Aufnahme eines initialen Diffraktionsmusters diente eine Rigaku MicroMax 007-HF Rotationsanode mit einem Kirkpatrick-Baez Spiegel und einem mar345dtb Bilddetektor. Die Aufnahme eines vollständigen Datensatzes für die Strukturbestimmung erfolgte letztendlich an einem Synchrotron. Durch die dort generierte hochwertige monochromatische Röntgenstrahlung ist es möglich, auch mit kleinsten Proteinkristallen einen auswertbaren Datensatz zu erhalten. So konnten bereits mit nur einem 20 µm³ messenden Kristall Strukturen bis zu einer Auflösung von 1,5 Å bestimmt werden [105].

2.7.3 Röntgenkristallographische Datenauswertung

Um eine Proteinstruktur zu bestimmen, müssen die durch ein Diffraktionsexperiment erhaltenen Daten in vielfältiger Weise prozessiert werden. Das Ziel der Datenerfassung ist es, die Intensitäten möglichst vieler Reflexionen konsistent zu messen und den Reflexionen innerhalb

des reziproken Raumes einen Koordinatensatz zuzuweisen. Dieser Koordinatensatz besteht aus drei Raumkoordinaten, auch Millersche Indizes (h , k , l) genannt. Nach der Datenerfassung müssen die Rohdaten bearbeitet werden, damit Messungenauigkeiten ausgeglichen werden, um so konsistente Intensitäten und eine hinreichende Zahl akkurat bestimmter Messpunkte zu erhalten [106]. Für diese initiale Datenaufbereitung wurde das Programm XDS verwendet [107] [108]. XDS dient zur Modellierung gemessener Reflexionen, der Integration ihrer Intensitäten, der Korrektur und dem Skalieren der Daten sowie der Bestimmung der Raumgruppe [109].

Die Lösung des Phasenproblems erwies sich als überaus schwierig. Hier wurde die Methode des Molekularen Ersatzes gewählt. Aufgrund geringer Sequenzhomologie der PfNaMNAT mit anderen Proteinen konnte hierfür nicht direkt auf eine gelöste Struktur zurückgegriffen werden. Stattdessen wurde für PfNaMNAT ein Homologiemodell erstellt. Für ein automatisiertes, vergleichendes Modellieren der dreidimensionalen Proteinstruktur von PfNaMNAT wurde SWISS-MODEL verwendet [110]. Das von SWISS-MODEL erstellte Modell basierte auf der A-Kette der Protein Struktur von *Staphylococcus aureus* NaMNAT (PDB-Code: 2H29) [111]. Mittels dieses Modells sollte unter Verwendung der Programme PHENIX [112] und CNS [113] die Phase bestimmt werden. Dies gelang jedoch erst mit dem Datensatz eines zweiten PfNaMNAT Kristalls, da im Laufe des Verfeinerungsprozesses mit dem ersten Datensatz die R-Faktoren nicht unter 40 % reduziert werden konnten. Für die sukzessive Verfeinerung der Struktur wurden die beiden Programme O [114] und Coot [115] verwendet. Mit diesen beiden Programmen wurde das gegebene Strukturmodell an die vorhandene Elektronendichtekarte angepasst. Ebenso wurde hierüber die Konformation des Modells überprüft und gegebenenfalls den chemischen Realitäten gemäß angepasst. Die Optimierung der Struktur erfolgte in einem iterativen Prozess aus Verfeinerung des Modells und Berechnung einer verbesserten Elektronendichtekarte. Hierbei wurde die Phaseninformation sukzessive verbessert. Die jeweiligen Fortschritte oder auch Regressionen konnten anhand der Entwicklung der R-Faktoren (R_{free} und R_{work}) evaluiert werden. Im Laufe des Verfeinerungsprozesses erfolgte ein vielfacher Vergleich mit den Strukturen homologer Proteine.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine strukturelle Untersuchung verschiedener Proteine des Malariaparasiten *P. falciparum* mittels Röntgenkristallographie erfolgen. Dabei lag ein, wenn auch nicht exklusiver, Fokus auf den Proteinen des NAD-Syntheseweges. Für diese Proteine sollte das jeweilige Gen aus einer cDNA-Bank kloniert sowie ein adäquates Expressionssystem etabliert werden. Da die Kristallisation von Proteinen eine sehr langwierige Methode ohne Erfolgsgarantie darstellt, stand jedoch nicht zu erwarten, dass sie für alle Proteine zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen sein würde. Im Zentrum der Anstrengungen befand sich dabei die PfNaMNAT, da sie für die NAD-Synthese von zentraler Bedeutung ist. Sie wurde bereits bei einer Vielzahl anderer Organismen untersucht, so dass auch ein Strukturvergleich mit homologen Proteinen möglich war.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit die *ab initio* Kristallisation von Plasmoredoxin (Plrx) erzielt werden. Dieses, nach gegenwärtigem Kenntnisstand, auf das Genus *Plasmodium* beschränkte Protein hatte sich lange Zeit der Kristallisation entzogen [116].

3.1 NaPRT

3.1.1 Molekulare Klonierung von NaPRT

Bereits im Vorfeld zu dieser Arbeit waren in der AG-Becker zwei verschiedene Plasmidvektoren für die Expression und Synthese von NaPRT konstruiert worden. Aus einer im Haus befindlichen cDNA-Bank waren hierzu mit den Primern NaPRT-BamHI und NaPRT-HindIII entsprechende PCR-Fragmente generiert worden. Dieses PCR-Produkt war schließlich über die in die Primer integrierten Restriktionsschnittstellen in die beiden Vektoren pQE30 und pRSET A integriert worden. Durch diese Klonierung erhielten beide Konstrukte jeweils einen N-terminalen His₆-Tag. Im Fall des pRSET A-Vektors war dieser Tag über eine Enterokinaschnittstelle potentiell abspaltbar. Da im Laufe der späteren Proteinreinigung im SDS-Gel häufig unerwünschte Banden auftraten erfolgte zudem eine Subklonierung, in deren Verlauf das für die NaPRT codierende Gen in den Plasmidvektor pET28a eingefügt wurde. Für das Erstellen eines PCR-Fragmentes kamen die Primer NaPRT-NcoI und NaPRT-XhoI zum Einsatz. Dieses Konstrukt wies nur einen C-terminalen His₆-Tag auf.

3.1.2 Expression und Optimierung der Reinigung von NaPRT

Durch die vorausgegangenen Klonierungen waren verschiedenen Optionen zur Proteinproduktion von NaPRT gegeben. Hierzu zählten das T5- als auch T7-Expressionssystem sowie verschiedene *E. coli*-Stämme. Aber auch die dabei produzierten rekombinanten Proteine waren nicht gänzlich identisch. Durch die jeweiligen His₆-Tags war die rechnerische Größe der Proteine unterschiedlich (pQE30-NaPRT und pET28a-NaPRT: 78 kDa, pRSET A-NaPRT: 81 kDa). Bei der Reinigung des Proteins war häufig eine Doppelbande zu verzeichnen (siehe Abb. 3.1). Da diese zweite Bande nur geringfügig unterhalb der eigentlichen NaPRT-Bande auftrat, konnte sie auch mittels Gelfiltration nicht vollständig eliminiert werden (siehe Abb. 3.2). Im Verlauf einer Vielzahl von Reinigungen von NaPRT fiel auf, dass diese unerwünschte Bande zwar häufig auftrat, jedoch nicht immer. Eine Kausalität, welche diese Bande zur Folge hatte, konnte allerdings nicht identifiziert werden. Auch das Testen der verschiedenen Konstrukte und Expressionssysteme erbrachte keinen endgültigen Aufschluss. Da im Western Blot nur eine Bande detektiert werden konnte (siehe Abb. 3.2), ist nicht zu vermuten, dass es sich hier um ein Abbruchprodukt der NaPRT-Translation handelt, zumal in dem untersuchten Fall ein N-terminaler His₆-Tag gegeben war und dieser auch bei einem Abbruchprodukt noch vorhanden sein sollte. Daher ist zu vermuten, dass es sich hier um eine unspezifische Interaktion mit NaPRT handelt. Um hier Klarheit zu erzielen, erscheint eine Sequenzierung respektive massenspektrometrische Untersuchung der unteren Bande als adäquate Option.

Darüber hinaus wurden auch verschiedene Medien zur Produktion von NaPRT herangezogen und deren Einfluss untersucht. Für die Expression von pET28a-NaPRT erwies sich LB-Medium am geeignetsten (Daten nicht gezeigt). Schließlich wurde auch die Temperatur, unter der die Expression erfolgte, variiert. Letztlich wurde die Bakterienkultur bei 37 °C herangezüchtet und nach der Induktion über Nacht bei RT inkubiert.

Aufgrund des relativ langen N-terminalen Anhangs des pRSET A-Konstruktes (36 Aminosäuren mit His₆-Tag, T7 *gene 10 leader*, Xpress Epitop und Enterokinase-Schnittstelle) wurden die beiden anderen rekombinanten Varianten von NaPRT im Weiteren bevorzugt verwendet. Da letztlich eine Kristallisation erfolgen sollte, war hier eine Interferenz, eines derartig langen Tags, mit der Kristallisation zu befürchten. Hier ergab sich das Problem, dass pET28a-NaPRT nach anfänglichen Erfolgen nicht mehr exprimierte. Nach der Reinigung des Proteins mittels IMAC über Talon-Säulenmaterial konnte kein Protein in den Eluatzen vorgefunden werden. Die Ursache dieses Problems konnte bislang nicht eruiert werden.

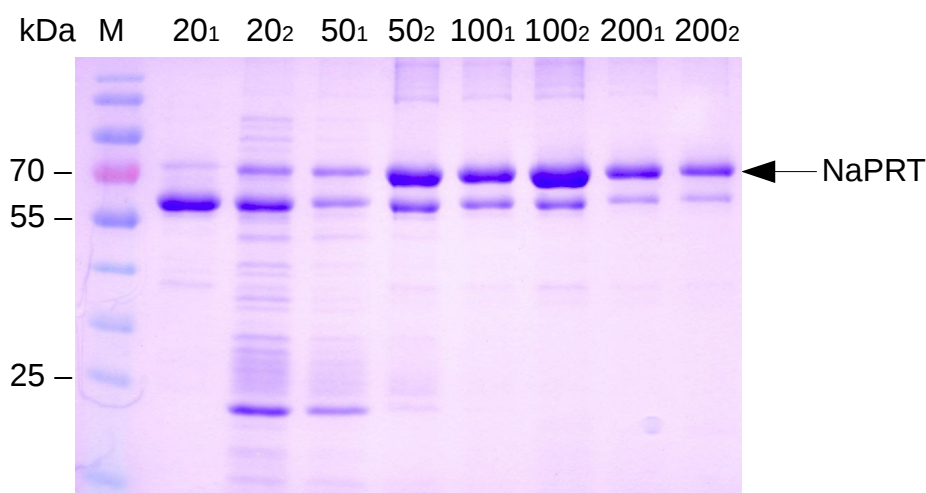


Abb. 3.1: SDS-Gel zur Reinigung von NaPRT mittels IMAC.

In der überwiegenden Zahl der Reinigungen war in den Eluatn eine Doppelbande gegeben. Dies gilt sowohl für das hier gezeigte pQE30-Konstrukt sowie für die Proteine der beiden anderen Expressionsvektoren. Die Elution der Proteine erfolgte in einem aufsteigenden Imidazolgradienten (20 bis 200 mM). Mit jeder Imidazolkonzentration wurden nacheinander zwei Fraktionen gesammelt (erkennlich an den Indices 1 und 2).

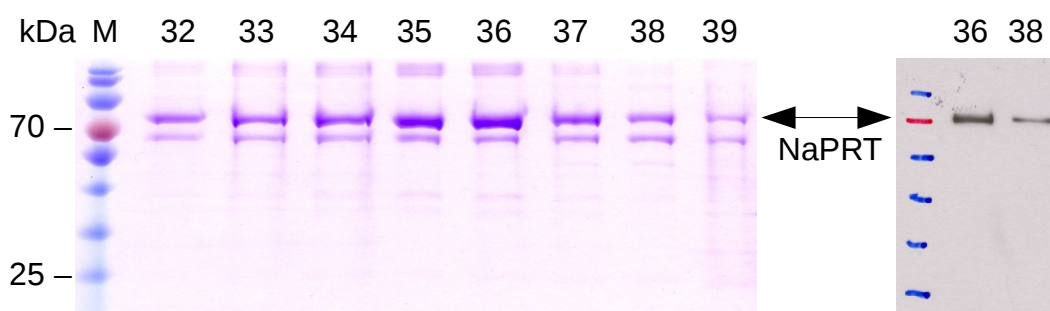


Abb. 3.2: Fraktionen der Gelfiltration von NaPRT im SDS-Gel und begleitender Western Blot.

Die Reinheit des über IMAC gereinigte Proteins sollte durch eine Gelfiltration weiter gesteigert werden. Das zugehörige Chromatogramm aus Abb. 3.3 (A) ließ jedoch keinen Elutionspeak erkennen. In allen Fraktionen tritt die Doppelbande auf. Im Western Blot konnte jedoch nur eine Bande nachgewiesen werden. Für den Western Blot wurden die Fraktionen 36 und 38 herangezogen. Für diese Reinigung wurde NaPRT mit dem pQE30-Vektor produziert.

Um die Reinheit des Proteins zu maximieren sowie um den Dimerisierungsstatus der Proteins zu analysieren erfolgte eine Gelfiltration mit Superdex 200 (HiLoad™ 16/60). Die Elution erfolgte jedoch nicht in einem eindeutigen Peak (siehe Abb. 3.3 (A)). Die Analyse der jeweiligen Fraktionen erbrachte jedoch nur die übliche Doppelband (siehe Abb. 3.2). Somit stand zu vermuten, dass sich NaPRT in verschiedensten Aggregaten zusammenlagerte. Um diese aufzulösen, wurden verschiedenste Pufferbedingen während des FPLC-Laufes getestet. Erfolg erbrachte schließlich die Nutzung eines Reduktionsmittels. Es konnte ein weitaus schärfer abgegrenzter Elutionspeak erzielt werden (siehe Abb. 3.3 (B)). Das Elutionsmaximum ist bei ca. 71,5 ml gegeben, was ca. einem 160 kDa großen Protein entspricht. NaPRT könnte daher ein

Dimer formen, auch wenn dimere Proteine eher bei rechnerisch niedrigeren Molekulargewichten eluieren. Der finale Puffer von NaPRT setzte sich daher aus 300 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,8 und 1 mM TCEP zusammen.

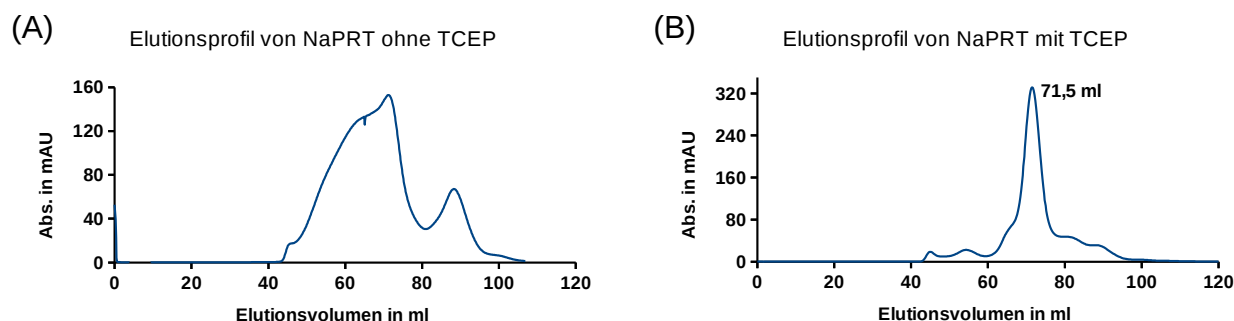


Abb. 3.3: Auswirkung von Reduktion auf das Elutionsprofil von NaPRT.

Für NaPRT war anfänglich kein scharfer Elutionspeak gegeben (A). Vielmehr eluierte das Protein in einem Kontinuum verschiedenster Aggregate. Erst der Zusatz des Reduktionsmittels TCEP erbrachte ein klar abgegrenztes Elutionsmaximum (B). Beide Chromatogramme wurden mit dem pQE30-Konstrukt der NaPRT erstellt. Der Peak entspricht einem Molekulargewicht von ca. 160 kDa.

3.1.3 Kristallisationsversuche von NaPRT

Diejenigen Reinigungen von NaPRT, welche einen akzeptablen Reinheitsgrad sowie nur eine geringfügige Doppelbande aufwiesen, wurden für Kristallisationsexperimente herangezogen. Zunächst wurde jedoch mit SWISS-MODEL ein Homologiemodell der NaPRT erstellt. Als Modellierungsvorlage diente das homologe Enzym von *Enterococcus faecalis* (PDB 2F7F). Es konnten jedoch nur die Aminosäuren 148 bis 661 modelliert werden. Diesem Modell war eine Identität von 28,6 % gegeben. Da nicht einmal das gesamte Protein modelliert werden konnte, wurde direkt mit einem *screening* begonnen und keine Kristallisationsbedingungen homologer Proteine getestet. Getestet wurde dabei zunächst die JCSG Core Suite für alle drei Proteinvarianten mit einer Konzentration von 10 mg/ml. Bei den ersten Versuchen war hier jedoch noch kein Reduktionsmittel vorhanden, da die Problematik der Aggregation erst später gänzlich klar wurde. Anschließende Kristallisations-*screens* erfolgten mit dem pQE30-Konstrukt der NaPRT sowie dem Zusatz von TCEP. Da bei der Nutzung von 10 mg/ml in nahezu allen Bedingungen Protein ausfiel, wurde hier zunächst die Konzentration schrittweise verringert. Auch bei 8 und 6 mg/ml präzipitierte noch der überwiegende Teil der Testbedingungen. Letztlich erfolgte ein umfassender Kristallisations-*screen* mit 4,5 mg/ml, wobei eine angemessene Mischung aus präzipitierten und klaren Kristallisationsbedingungen gegeben war. Bei dieser Kristallisation wurden allerdings auch noch verschiedenen Zusätze getestet, dies sind je ca. 6 mM NaMN oder NMN. Ein weiterer Ansatz erfolgte mit 6 mM Nicotinsäure sowie 25 mM

LiSO₄. Letzteres wurde zugegeben, da auch in der 2F7F-Struktur SO₄ im aktiven Zentrum gebunden ist. Generell erfolgte der Substrat- respektive Produktzusatz, um die Struktur des Proteins zu stabilisieren und so die Kristallisation zu fördern. Außerdem wurde mit Polystyrolnanosphären und Nicotinsäure mit LiSO₄ ein *seeding*-Ansatz erstellt. *Seeding*-Tests erfolgten nur mit der JCSG Core Suite. Für die anderen Tests wurde sowohl dieser *screen* als auch JBScreen Wizard 1 & 2 HTS, die MPD Suite sowie die der AG-Becker eigenen *screens* getestet. Im Verlauf der Kristallisations-*screens* wurden mehrere tausend Bedingungen getestet, ein Proteinkristall konnte jedoch trotz aller Anstrengungen nicht erhalten werden.

Bevor weitere Versuche zur Kristallisation von NaPRT erfolgen, sollte die Reinigung respektive die Genexpression selbst optimiert werden. Es ist zu empfehlen die Identität der Doppelbande aufzuklären. Sollte sich z.B. ein chimäres NaPRT aus *E. coli* und *P. falciparum* Protein oder auch einem beliebigen anderen Protein zusammenlagern, so ist hier kaum mit einem geordneten Kristallwachstum zu rechnen.

3.1.4 Erster Versuch einer kinetischen Charakterisierung von NaPRT

Außerdem wurde der Versuch einer kinetischen Charakterisierung von NaPRT unternommen. Hierzu sollte ein bereits zuvor beschriebenes Verfahren herangezogen werden [56]. Der Substratverbrauch respektive die Produktbildung sollten dabei mittels einer *reverse-phase*-HPLC-Analyse erfolgen (Supelcosil LC-18-DB Säule). Eine Trennung von Nicotinsäure und Nicotinsäuremononukleotid war dabei jedoch nicht in hinreichendem Maße zu realisieren.

Da diese Methode keinen gangbaren Weg bot, wurde ein Versuch unternommen, die Reaktion indirekt über die Bildung von P_i zu beobachten. Hierzu kamen Ascorbat/Ammoniummolybdat- als auch Ammoniummolybdat/Malachitgrün-Reagenz zum Einsatz. In beiden Fällen trat jedoch eine derart starke Hintergrundfärbung auf, dass keine Messung möglich war. Dies wurde auf das Substrat Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) zurückgeführt. Hierbei handelt es sich um eine relativ instabile Substanz. Der Hersteller Sigma Aldrich gibt eine Zersetzung von 3 % pro Tag bei 25 °C an. Auch die Reinheit wird nur mit ≥ 75 % beziffert. Es ist daher davon auszugehen, dass PRPP bereits eine hohe Menge freien Phosphates bzw. Pyrophosphates enthält. Ausgehend von der ungenauen Konzentrationsangabe wäre hier eine exakte kinetische Charakterisierung dieses Substrats ohnehin kaum machbar. Von weiteren Versuchen wurde an dieser Stelle zu Gunsten der PfNaMNAT abgesehen, zumal hier erfolgversprechendere Rahmenbedingungen gegeben waren.

3.2 PfNaMNAT

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der PfNaMNAT lag, soll dieses Enzym im Folgenden am ausführlichsten beschrieben werden.

3.2.1 Expression und optimierte Reinigung von PfNaMNAT

Als Expressionsvektor für PfNaMNAT wurde das Plasmid pET28a herangezogen. Die Sequenz der PfNaMNAT wurde mittels PCR aus einer cDNA-Bank von *P. falciparum* isoliert. Hierzu wurden die beiden Primer NaMNAT-NcoI und NaMNAT-XhoI herangezogen. Über die in die beiden Primer integrierten Restriktionsschnittstellen wurde die Sequenz der PfNaMNAT in den Vektor integriert. So konnte ein Plasmidvektor erhalten werden, welcher für eine rekombinante PfNaMNAT, der rechnerischen Größe von 25 kDa, mit einem C-terminalen His₆-Tag codiert. Dieses Plasmid wurde pET28a-NaMNAT genannt. Mit ihm wurden KRX-Zellen transformiert um eine zielgerichtete Synthese der PfNaMNAT zu ermöglichen. Eine Optimierung der Expressionsbedingungen erfolgte innerhalb der Masterarbeit von Christina Brandstädter [117]. Dabei erwies sich LB als geeignetes Kulturmedium. Die Anzucht der Expressionskultur erfolgte bei 37 °C, die eigentliche Expressionsphase erfolgte nach der Induktion bei RT über Nacht. Auffällig ist hierbei, dass eine Induktion der Expression mittels Rhamnose hinreichend war, durch Zusatz von IPTG konnte keine höhere Proteinausbeute erzielt werden.

Die Reinigung des Proteins erfolgte mittels IMAC, als Säulenmaterial wurde dabei TALON-Granulat verwendet. Nach einem Waschschrift mit NaMNAT-Lagerungspuffer erfolgte eine Umpufferung, des an die Säule gebundenen Proteins, zu Kristallisations- oder Kinetikpuffer, je nachdem wofür das Protein verwendet werden sollte. Der Kinetikpuffer enthielt dabei jeweils 100 mM Arginin und Glutamat. Da NaMNAT dazu tendiert auszufallen, wurden diese beiden Zusätze zur Stabilisierung des Proteins verwendet [118]). Die Kristallisationsbedingungen dagegen sollten möglichst einfach gehalten werden, daher wurde hierzu ein anderer Puffer herangezogen.

Zur Elution des Proteins von der Säule wurde ein aufsteigender Imidazolgradient verwendet. Da sich im Laufe der kinetischen Charakterisierung der PfNaMNAT zeigte, dass das Protein oxidationssensitiv ist, wurden die Eluate mit 1,5 mM TCEP versetzt. Ohne den Zusatz dieses Reduktionsmittels büßte das Protein seine Aktivität innerhalb weniger Tage zu einem großen Teil ein. Die Fraktionen 50 – 200, oder mit entsprechendem Reinheitsgrad, wurden in einem Zentrifugalkonzentrator vereinigt, konzentriert und mehrmals gewaschen um das Imidazol zu entfernen. Der jeweilige Puffer enthielt dabei immer 1,5 mM TCEP. Die resultierende Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt.

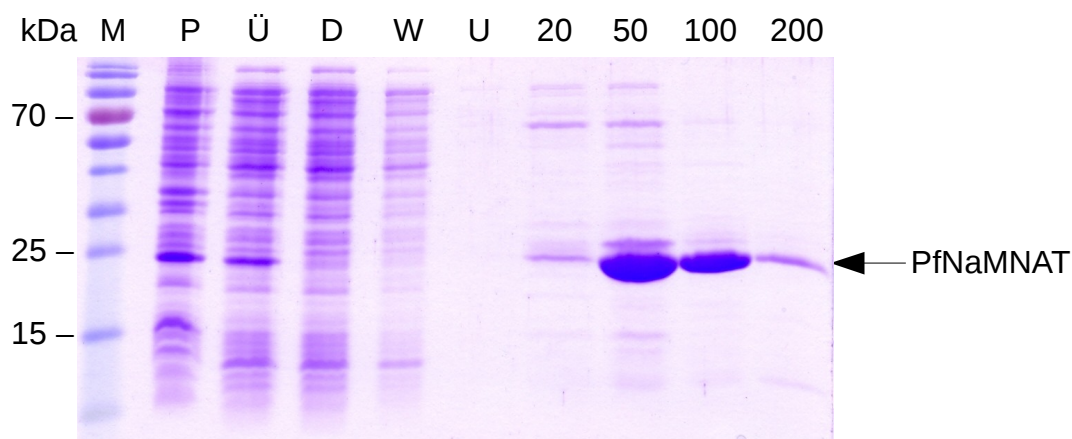


Abb. 3.4: Reinigung der PfNaMNAT.

PfNaMNAT wurde über IMAC gereinigt und die jeweiligen Fraktionen der Reinigung mit einem 15-%igen SDS-Gel visualisiert. Die Reinigung wurde auch zur Umpufferung des Proteins genutzt. Über einen aufsteigenden Imidazolgradienten erfolgte die Elution des Proteins. Die Expressionsbande von PfNaMNAT (25 kDa) ist durch einen Pfeil indiziert. (Abkürzungen: M = Marker, P = Pellet, Ü = Überstand, D = Durchlauf, W = Waschschrift, U = Umpufferung, 20 – 200 = verschiedene Imidazolkonzentrationen)

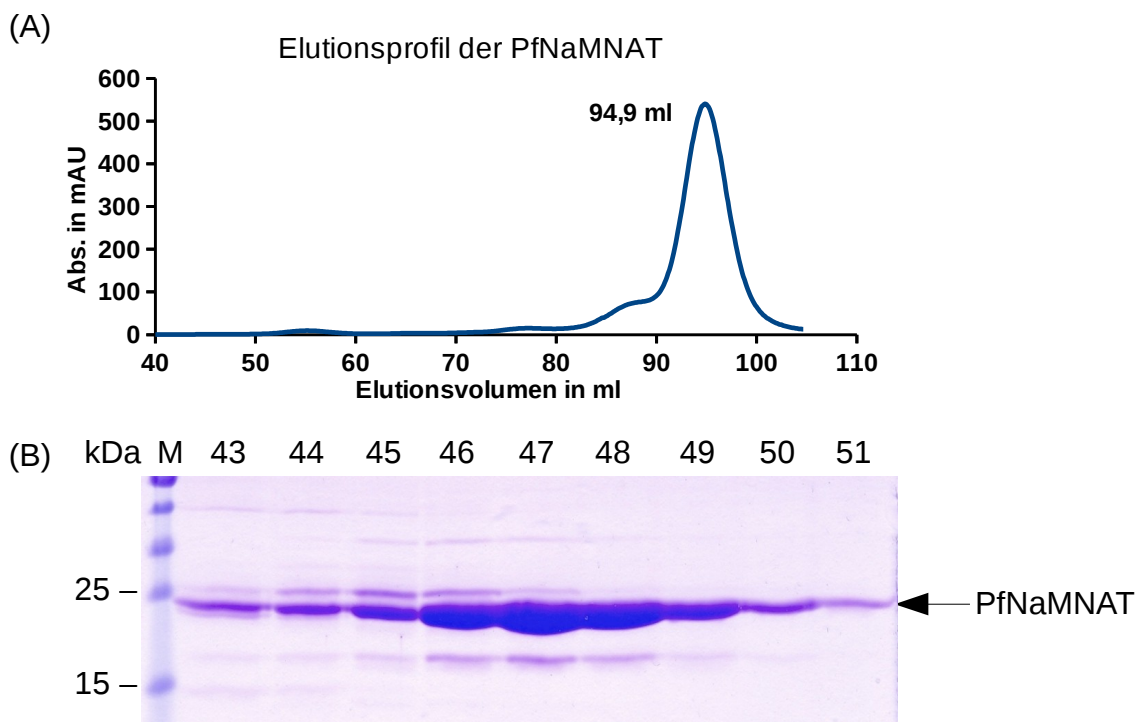


Abb. 3.5: Elutionsprofil der Gelfiltration von PfNaMNAT.

Für die Kristallisation wurde der Reinheitsgrad der PfNaMNAT mittels Größenausschlusschromatographie maximiert. Die hier gezeigte Reinigung stammt vom 25. Feb 2014. Sie diente dazu, NaMNAT mit Produktzusatz von NaAD und NAD zu kristallisieren, wofür die Fraktionen 47 – 51 genutzt wurden. (A) UV-Chromatogramm zur Gelfiltration, mit Elutionspeak bei 94,9 ml (entspricht ca. 22 kDa). (B) Korrespondierende SDS-PAGE zu dem Elutionspeak.

Protein, welches für eine kinetische Charakterisierung bestimmt war, konnte nun direkt verwendet werden. Für die Proteinkristallisation wurde ein weiterer Reinigungsschritt involviert. Durch eine Größenausschlusschromatographie konnte die Reinheit maximiert werden (siehe Abb. 3.5). Hierbei enthielt der Laufpuffer kein TCEP, dieses wurde dem Eluat jedoch wieder mit einer Endkonzentration von 1,5 mM zugesetzt. Die Reinheit der Fraktionen des Elutionspeaks wurde mit einer weiteren SDS-PAGE evaluiert. Hierüber konnte ein sehr hoher, wenn auch nicht 100-%iger, Reinheitsgrad erzielt werden (siehe Abb. 3.5). Die reinsten Fraktionen wurden erneut mit einem Zentrifugalkonzentrator eingengt und die resultierende Konzentration mit einem Bradford-Test ermittelt.

3.2.2 Kristallisation von PfNaMNAT

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Strukturaufklärung der PfNaMNAT. Hierzu sollte die Methode der Röntgenkristallographie genutzt werden. Daher galt es zunächst, eine adäquate Kristallisationsbedingung für die PfNaMNAT ausfindig zu machen. Hierzu wurde eine Vielzahl verschiedener *screening* Verfahren herangezogen, in deren Verlauf nahezu 15.000 Kristallisationsansätze getestet wurden. Diese Suche soll im Folgenden mit ihren wichtigsten Zwischenschritten beschrieben werden.

3.2.2.1 Initiale Suche einer Kristallisationsbedingung

Homologe Proteine weisen mitunter ähnliche Kristallisationsbedingungen auf. Für die Kristallisation ist dabei entscheidend, dass die Oberflächen der Proteine einander sehr ähneln, da diese für die Interaktion innerhalb des Kristalls verantwortlich sind. Die Oberfläche eines Proteins weist jedoch einen geringen Konservierungsgrad auf. Damit zwei Proteine somit unter vergleichbaren Bedingungen kristallisieren, ist ein hoher Homologiegrad unabdingbare Prämisse. PfNaMNAT weist jedoch nur eine geringe Homologie zu anderen NaMNATs bekannter Struktur auf (siehe Abb. 3.24 Seite 94). Ein erster Handansatz wurde angelehnt an die Kristallisationsbedingung der *Bacillus anthracis* NaMNAT erstellt [119]. Trotz Variation der Ursprungsbedingung konnte kein Kristallwachstum erzielt werden. Ein weiterer Kristallisationsversuch lehnte sich an die Kristallisationsbedingung der *Staphylococcus aureus* NaMNAT an [120]. Da diese Struktur NaAD als Liganden gebunden hat, wurde dies dem Kristallisationsansatz der PfNaMNAT ebenfalls zugegeben. Jedoch konnte auch hier kein Kristall erhalten werden. Aufgrund der marginalen Erfolgsaussichten unter Berücksichtigung des geringen Homologiegrades wurden keine weiteren Kristallisationsbedingungen homologer Proteine getestet. Stattdessen sollte eine hinreichende Kristallisationsbedingung *de novo* bestimmt werden.

Als Ausgangspunkt für die Suche nach einer Kristallisationsbedingung für PfNaMNAT diente die JCSG Core Suite von Qiagen. Der Hersteller gibt für diesen *screen* an, dass es sich um die 384 Bedingungen mit den höchsten Trefferquoten am *Joint Center for Structural Genomics* handelt. Dies stellt somit einen guten Kompromiss aus Quantität und Qualität zu testender Kristallisationsbedingungen dar. In einem ersten *screening* wurden JCSG Core I-III getestet, wobei NaMNAT mit 9,5 mg/ml in einem Kinetikpuffer vorlag (Arginin und Glutamat haltiger Puffer). Um die Kristallisationsbedingung möglichst schlicht zu halten, wurde jedoch im weiteren ein anderer Kristallisationspuffer verwendet. Dieser Puffer (50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl) wies einen pH-Wert nahe des rechnerischen pI der PfNaMNAT auf. Allgemein kann man davon ausgehen, dass ein Protein bei seinem pI eine neutrale Ladungsverteilung aufweist, wodurch die Zusammenlagerung innerhalb eines Kristalls begünstigt wird. Hier wurde die gesamte JCSG Core Suite getestet. Zudem kamen Salz- und PEG-*screen* zum Einsatz. Die Konzentration der PfNaMNAT lag bei 10 mg/ml. Innerhalb dieses *screening* konnte eine initiale Kristallisationsbedingung identifiziert werden, es ist dies JCSG Core III *well* C12 mit 0,2 M NaCl, 0,1 M Tris pH 7,2 und 35 % MPD. Die dabei erhaltenen Mikrokristalle (siehe Abb. 3.6) waren nur durch das Variieren der Durchlichteinstellungen des Mikroskops zu erkennen.

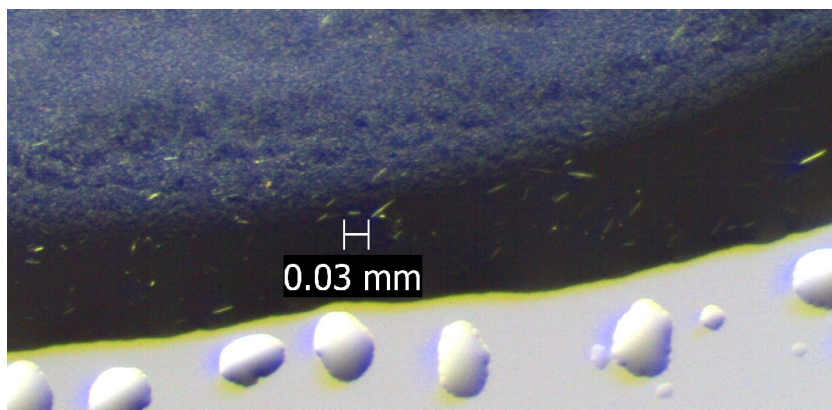


Abb. 3.6: Mikrokristalle von PfNaMNAT in einer ersten Kristallisationsbedingung.

In einem *screening* der JCSG Core Suite konnte eine erste Kristallisationsbedingung für PfNaMNAT identifiziert werden. Die nadelförmigen Mikrokristalle treten verstärkt am Rand des Präzipitats sowie im angrenzenden klaren Flüssigkeitsvolumen (nahe zu schwarzer Bereich innerhalb der Abbildung) auf.

3.2.2.2 Optimierung einer ersten Kristallisationsbedingung

Da die identifizierte Kristallisationsbedingung keine für eine röntgenkristallographische Analyse hinreichend großen Kristalle lieferte, wurde versucht dies zu optimieren. Hierzu wurden verschiedene Handansätze erstellt und dabei die Protein- sowie MPD-Konzentration variiert. Außerdem wurden zudem verschiedene pH-Werte getestet, wobei der Tris-Puffer aus C12 gegen

Natriumacetat und Bis-Tris ausgetauscht wurde, um auch geringere pH Werte zu testen. Die Erhöhung der MPD-Konzentration erzielte dabei die besten Resultate, sodass sich die Dimensionen der zuvor erhaltenen Nadeln vergrößerten.

Es schloss sich ein zweiter Optimierungsschritt an, innerhalb dessen nur noch die Konzentrationen des MPD (42 – 52 %) und der PfNaMNAT (2 – 8 mg/ml) variiert wurden. Wiederum konnten so die Dimensionen der Kristalle gesteigert werden, wobei sich eine MPD-Konzentration zwischen 44 und 48 % in Kombination mit einer Proteinkonzentration von 6 und 8 mg/ml als am besten geeignet erwies. Die dabei erhaltenen Kristalle waren deutlich größer als die der Ausgangsbedingung (siehe Abb. 3.7). Ihre Länge konnte etwa um einen Faktor 10 gesteigert werden, von ca. 0,03 mm auf 0,3 mm. Außerdem lagen nun nicht mehr nur Nadeln vor, sondern Plättchen. Ihre Ausdehnung in der dritten Dimension war dagegen sehr begrenzt. Um evtl. eine Stabilisierung der Proteinstruktur und somit möglicherweise größere Proteinkristalle zu erhalten, wurde eine Cokristallisation mit Zusatz der Produkte der PfNaMNAT, NaAD und NAD, versucht. In späteren Experimenten wurde darüber hinaus auch der Zusatz des Substratanalogons ATP α S sowie der Substrate ATP, NaMN und NMN des Proteins getestet. Dies erbrachte jedoch in keinem der Fälle eine merkliche Verbesserung der Kristalldimensionen.

Letztendlich wurden die bislang besten erhaltenen Kristalle der PfNaMNAT für eine röntgenkristallographische Datenerfassung herangezogen. Diese erfolgte an der *Swiss Light Source* (SLS) des Paul Scherrer Instituts. Der dabei erhaltene Datensatz bestätigte noch einmal, dass es sich tatsächlich um Proteinkristalle und nicht etwa Salzkristalle handelte, jedoch war das Streuvermögen dieser Kristalle nicht hinreichend, um einen für die Strukturaufklärung nutzbaren Datensatz zu erhalten.

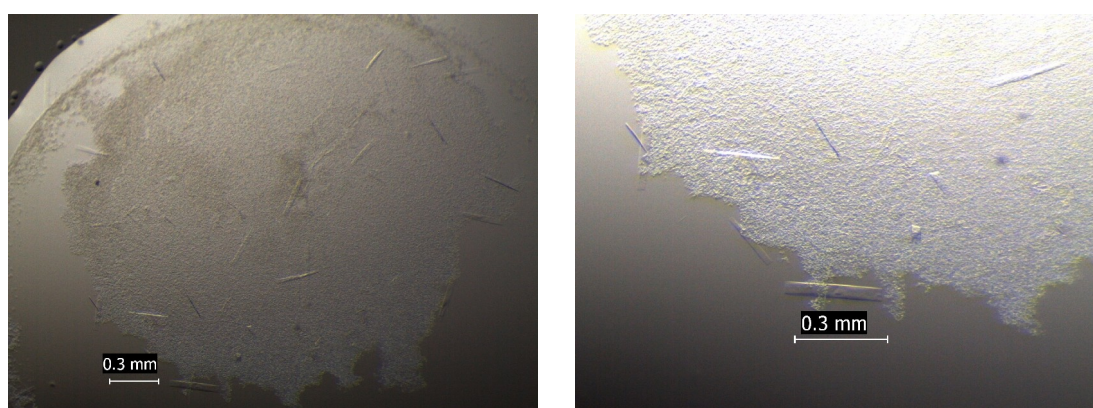


Abb. 3.7: PfNaMNAT Kristalle nach Optimierung der ersten Kristallisationsbedingung.

Durch die Optimierung der Kristallisationsbedingung aus JCSG Core III *well* C12 konnten die Dimensionen der anfänglichen Kristalle deutlich gesteigert werden. Nicht nur, dass ihre Länge um ca. einen Faktor 10 gesteigert wurde, auch ihre Ausdehnung ist von Nadeln zu Platten angewachsen. Das Wachstum dieser Kristalle wurde in 0,2 M NaCl, 0,1 M Tris pH 7,0 mit MPD-Konzentrationen zwischen 44 und 46 % erzielt. Die Proteinkonzentration erwies sich als optimal zwischen 6 und 8 mg/ml.

3.2.2.3 Kristallisationsversuche mittels *seeding*-Verfahren

Da die bisherigen eher konventionellen Kristallisationsversuche erfolglos verliefen, wurde *seeding* als eine weitere Strategie herangezogen. Das zufällige *screening* von Kristallisationsscreens mit dem Zusatz von Mikrokristallen (*random microseed matrix-screening*, rMMS) wird als ein signifikanter Durchbruch in der Proteinkristallisation angesehen [97]. Diese ursprünglich von D'Arcy *et al.* beschriebene Methode [94] beruht auf dem Gedanken die Keimbildung von dem anschließenden Kristallwachstum zu entkoppeln [121]. Ireton und Stoddard nutzten schlecht streuende Kristalle zum *seeding*, wodurch sie eine verbesserte Kristallform sowie eine verkleinerte Einheitszelle erhalten konnten [96]. Unter den gegebenen Voraussetzungen erschien *seeding* somit als eine ideale Option die Qualität der gegebenen NaMNAT-Kristalle zu verbessern und evtl. weitere Kristallisationsbedingungen ausfindig zu machen.

Ein erstes *seeding* Experiment wurde am Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung in Heidelberg durchgeführt. Die bislang erhaltenen dünnen Kristallplättchen der PfNaMNAT dienten dabei als *seed stock*. Sie wurden in einem Eppendorftube gesammelt und durch Vortexen mit einer Glaskugel zu Mikrokristallen zerkleinert. Hiermit wurden schließlich die folgenden Kristallisationsscreens getestet: JCSG Core I-IV, MPD Suite, Wizard I & II HTS sowie Classic HTS I & II. NaMNAT wurde dazu mit 10 mg/ml genutzt. Die fortgesetzte Beobachtung dieser Kristallisationsansätze konnte die in die Methode gesetzten Erwartungen jedoch nicht bestätigen. Kristalle mit einer besseren Qualität wurden nicht erhalten.

Da man jedoch nicht immer die nötigen Mikrokristalle für ein rMMS zur Verfügung hat, wurden alternative Verfahren für ein heterogenes *seeding* entwickelt [97][122]. Kallio *et al.* zeigten in diesem Zusammenhang, dass ein *seeding* ebenfalls mit Polystyrennanosphären möglich ist [98]. Daher wurde das vormalig in Heidelberg erlernte Verfahren vor Ort in der AG Becker etabliert und ein *seeding* unter Nutzung von 8 und 12 mg/ml PfNaMNAT mit der JCSG Core Suite und 50 nm messenden Nanosphären durchgeführt. Auch diese Versuche verliefen erfolglos.

3.2.2.4 Kristallisationsversuche mit Zusatz von MgSO_4

Als nächste Kristallisationsstrategie wurde der Zusatz von Magnesiumsulfat (MgSO_4) zu den Kristallisationsansätzen getestet, da beide Ionen auch bei anderen NaMNAT-Strukturen als Liganden auftreten. Die Strukturen 2QTN und 3E27 weisen Magnesiumionen auf und 3DV2 hat mehrere Sulfationen gebunden [123][124][119]. Sulfationen sind teilweise in der Lage, die Position der Phosphate von ATP einzunehmen, sofern ATP eines der Substrate des Proteins darstellt. So hat auch 3DV2 zwei Sulfate im Bereich des aktiven Zentrums gebunden, wie es eine genauere Betrachtung der Struktur zeigt. Daher wurde ein *screening* mit 0,2 M MgSO_4 als Zusatz

zu 10 mg/ml PfNaMNAT durchgeführt. Getestet wurden dabei die JCSG Core Suit sowie der PEG und Salz *screen*. Dabei wurden in verschiedenen Bedingungen Sphärolithe erhalten (z.B. JCSG I B8 und JCSG II C7) sowie unter anderem ein vielversprechender Kristall in JCSG II G7 (siehe Abb. 3.8). Die Kristallisationsbedingung aus JCSG II G7 wurde in Handansätzen weiter verfolgt. Hierbei zeigte sich jedoch, dass es sich um Salzkristalle handelte. Da diese Bedingung Calciumacetat enthielten, ist davon auszugehen, dass es sich bei den entstandenen Kristallen um Calciumsulfat, also Gips, handelt. Vermutlich wäre eine geringere Konzentration von Magnesiumsulfat vorteilhaft gewesen, um das Wachstum von Salzkristallen zu minimieren.

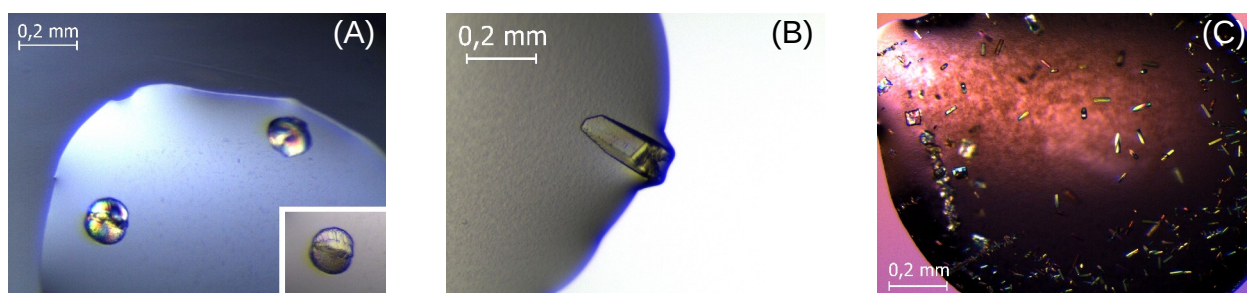


Abb. 3.8: Kristalle, welche durch den Zusatz von MgSO_4 erhalten wurden.

Bei den Kristallisationsversuchen mit Magnesiumsulfat wurden verschiedene Kristalle erhalten. Hier sind nur drei davon repräsentativ gezeigt. (A) Da diese Sphärolithe durch einen Polarisationsfilter aufgenommen wurden, schimmern sie in allen Farben des Regenbogens (normale Aufnahme zum Vergleich rechts unten). Man kann sie als vielversprechende Vorstufen von Kristallen verstehen. (B) Die Kristallisationsbedingung aus JCSG II G7 erbrachte einen Kristall. (C) In Handansätzen wurde dieser reproduziert. Es handelte sich jedoch vermutlich um Calciumsulfatkristalle. Die Aufnahme ist ebenfalls unter Verwendung eines Polfilters entstanden.

3.2.2.5 Kristallisationsversuche mittels Substratanaloga und Produkten

Parallel zur Kristallisation mit dem Zusatz von MgSO_4 wurde mit Kristallisationsversuchen begonnen, denen Substratanaloga sowie Produkte zugesetzt waren, es sind dies NaAD und das durch Jena Bioscience erhältliche *Non-hydrolyzable ATP Test Kit*. Die dahinterstehende Ratio ist bereits in Kapitel 2.7.1.5 auf Seite 60 beschrieben worden. Für dieses *screening* wurden sukzessive die JCSG Core sowie MPD Suite und PEG sowie Salz *screen* getestet. Unter den ATP Analoga befanden sich zwei α - β nicht hydrolysierbare ATP-Derivate ($\text{ATP}\alpha\text{S}$, ApCp) und drei β - γ nicht hydrolysierbare ATP-Derivate (AppCp , AppNHp , $\text{ATP}\gamma\text{S}$). Ein erster kleiner, jedoch erfolgversprechender Kristall konnte durch den Zusatz von $\text{ATP}\alpha\text{S}$ im *screen* JCSG Core IV G1 erhalten werden (Abb. 3.9 (A)). Diese Bedingung diente erneut als Grundlage zur Variation eines Handansatzes. Hierbei konnten mehrere außergewöhnliche, blüten- respektive sternförmige Kristalle erhalten werden (Abb. 3.9 (B)). Um zu verifizieren, dass es sich um Proteinkristalle handelte, wurden Kontrollansätze ohne Proteinzusatz erstellt. Es zeigte sich, dass auch hier die

gleichen Kristalle auftraten (Abb. 3.9 (C)).

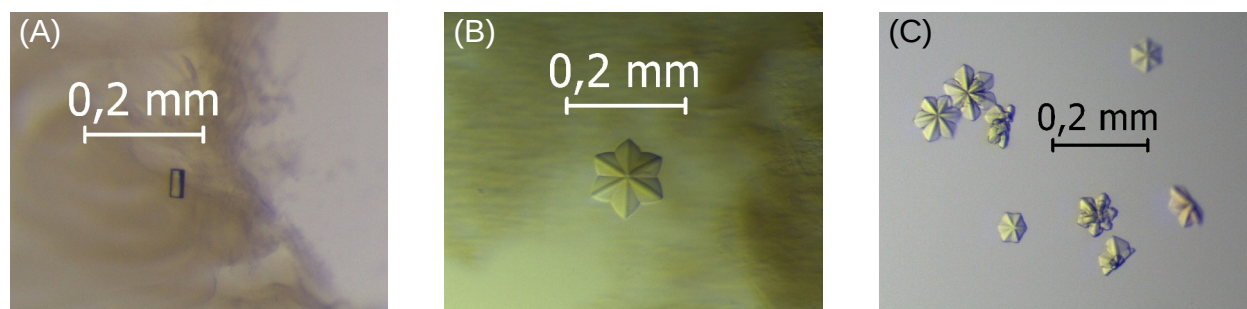


Abb. 3.9: Erster Optimierungsversuch mit Zusatz von ATP α S.

Bei dem Zusatz des ATP-Derivats ATP α S konnte ein kleiner Kristall erhalten werden (A). Durch die Variation dieser Ausgangsbedingung wurde schließlich ein außergewöhnlicher, blütenförmiger Kristall gezüchtet (B). Ein Kontrollansatz der gleichen Bedingung ohne die Zugabe von Protein zeigte jedoch, dass es sich hier um Salzkristalle handelte (C).

3.2.2.6 Optimierung der Kristallisation der PfNaMNAT

Dies war jedoch nicht die einzige im Laufe des *screening* gefundene aussichtsreiche Bedingung. Der Zusatz von ATP α S, ApCpp sowie NaAD zu der Bedingung JCSG Core I A2 (0,1 M Bicine pH 8,5, 20 % (w/v) PEG 6000, finaler pH 9,0) erbrachte jeweils eine Anordnung radialkonzentrisch ausgerichteter Kristallstrahlen (siehe Abb. 3.10 (A) und (B)). Eine derartige Anordnung kleiner Einzelkristalle zu einer „Seeigel-artigen Struktur“ lässt sich regelmäßig bei der Kristallisation von Lysozym beobachten. Hier ist dies in einem zu schnellen Kristallwachstum begründet. Eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit kann hier durch eine Temperaturabsenkung von Raumtemperatur auf 4 °C Abhilfe schaffen, es wachsen wohlgeordnete Lysozymkristalle. Daher wurde ausgehend von der gefundenen Bedingung je ein Handansatz mit ATP α S sowie ApCpp erstellt und jeweils einer bei Raumtemperatur und einer bei 4 °C gelagert. Hier konnte jedoch kein Kristallwachstum verzeichnet werden. Daher wurde eine Reihe eigener 96-well screens erstellt, welche die Variation der Bedingung A2 in einem größeren Maßstab ermöglichten. Getestet wurden dabei verschiedene Puffer (Tris, Bicine, CHES und Glycin) mit jeweils mehreren pH-Werten, einige Konzentrationen von Bicine und Tris sowie 16 – 28 % PEG. Im Weiteren erfolge eine Variation der Proteinkonzentration (4 °C, Raumtemperatur und in einem Fall auch 30 °C) sowie der Proteinkonzentration (8, 10, 12, 14, 16 und 18 mg/ml). Um innerhalb des Kristallisationstropfens noch einmal eine Erhöhung des pH-Wertes zu erzielen, wurde darüber hinaus der pH des Kristallisationspuffers von 7,2 auf 7,8 erhöht. Außerdem wurden einige Gegendiffusionsexperimente sowie ein *additive screen* erstellt. Im Laufe dieser Experimente konnte eine deutliche Verbesserung der Kristallformen und

-dimensionen erzielt werden (siehe Abb. 3.10 (C) und (D)). Einen vollständigen Datensatz lieferte schließlich ein Kristall, welcher mit dem Zusatz von ApCpp bei einer Proteinkonzentration von 14 mg/ml gezüchtet wurde (Abb. 3.10 (C)). Die Kristallisationslösung bestand aus 0,15 M Bicine pH 8,5 und 19 % PEG 6000. Der Kristall wurde schließlich in einen Cryopuffer, bestehend aus 0,15 M Bicine pH 8,5 und 22 % Ethylenglycol, überführt und schockgefroren. Die Messung erfolgte am DESY (Deutsches Elektronen-Synchrotron) an der Lichtquelle PETRA III.

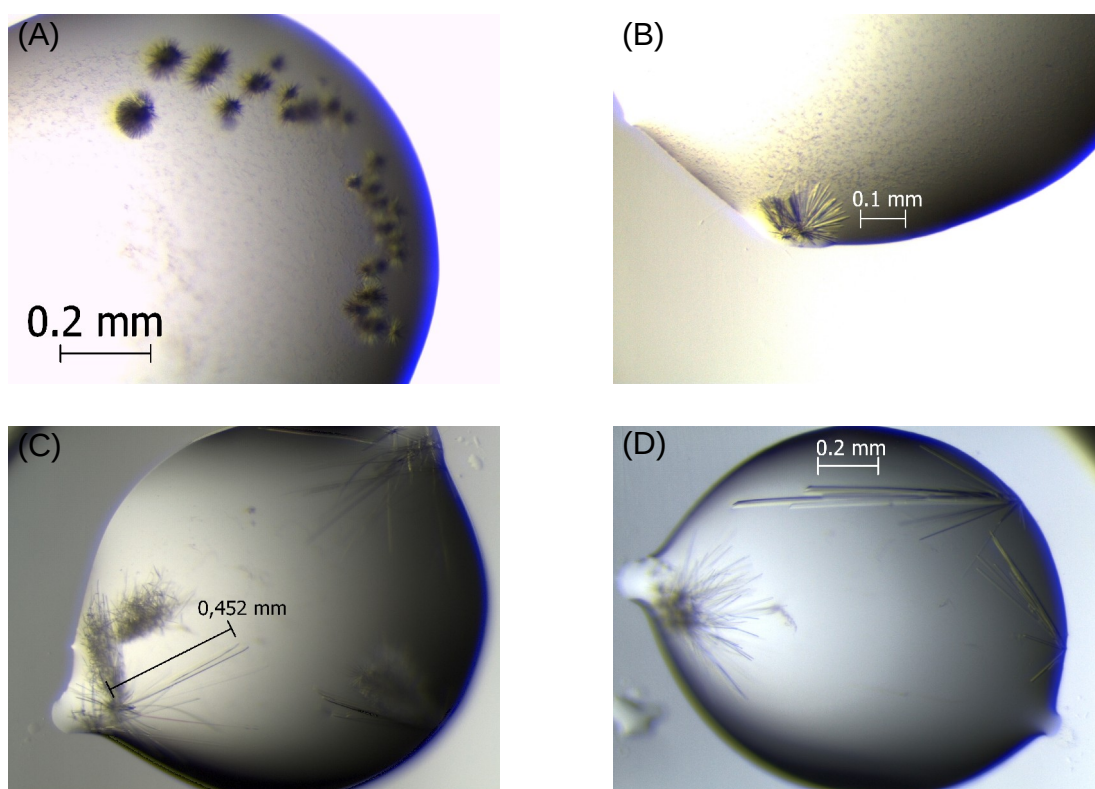


Abb. 3.10: Durch den Zusatz von ATP-Derivaten erhaltene PfNaMNAT-Kristalle.

Durch den Zusatz von α - β nicht hydrolysierbaren ATP-Derivaten gelang schließlich die Kristallisation der PfNaMNAT. In einem initialen *screen* mit ATP α S konnten in der Bedingung A2 des JCSG Core II einige erste radialkonzentrische Proteinkristalle erhalten werden (A). Der Zusatz von ApCpp erbrachte in der selben Bedingung gleichartige Kristalle. Durch die Variation dieser Ausgangsbedingung konnte die Größe der Kristalle deutlich gesteigert werden (C) (D) (HDR-Darstellung der Kristalle). Tatsächlich wurde mit den Kristallen aus (C) ein Datensatz aufgenommen.

3.2.2.7 Erster Lösungsversuch der Kristallstruktur

Der so erhaltene Datensatz lieferte Reflexe bis zu einer Auflösung von 1,99 Å, wobei aufgrund der Qualität der äußeren Reflexe letztendlich nur mit einer Auflösung bis zu 2,6 Å gearbeitet wurde. Die Prozessierung der Daten erfolgte mit XDS, wobei die Raumgruppe $P2_1$

vorgeschlagen wurde. Die Struktur selbst sollte über Molekularen Ersatz gelöst werden. Da noch keine Struktur der PfNaMNAT bekannt war, wurde hierfür zunächst unter Nutzung von SWISS-MODEL ein Homologiemodell des Proteins erstellt (Abb. 3.12). Als Vorlagenprotein diente dabei die Struktur 2H29 Kette A, der *Staphylococcus aureus* NaMNAT (SaNaMNAT). Modelliert wurden die Aminosäuren vier bis 203, wobei allerdings mit 28 % nur eine sehr geringe Sequenzidentität gegeben war (berechnet mit SIAS). Dies liegt am unteren Ende dessen, was für Molekularen Ersatz noch verwertbar ist. Die Suche nach einer korrekten Lösung des Phasenproblems sollte sich daher auch als äußerst schwierig erweisen.

PfNaMNAT	(1)	KNICIYG	GSFDPITYAH	EMVLDKISNL	NWIHEIWVVI	CRCR---	NDK
SaNaMNAT	(1)	M--KKIVLYG	GQFNPIHTAH	MIVASEVFHE	LQPDEFYFLP	SFMSPLKHH	
PfNaMNAT	(5)	SLTEFHHRHN	MFTIINNSS	KI	IKSKIFLK	DLESHSEMP	TYDLLKTQKE
SaNaMNAT	(49)	DFIDVQHRLT	MIQMIIDELG	FGD	ICDDEIK	----RGGQSY	TYDTIKAFKE
PfNaMNAT	(95)	LHPNYTFYFG	LGSDLICDIF	SWDEGEKLV	ENAFIIIERG	HKIDESILK	
SaNaMNAT	(95)	QHKDSELYFV	IGTDQYNQLE	KWYQIEYLKE	MVTFVVNRD	KNSQNVE---	
PfNaMNAT	(145)	KFPKYYLINI	PKLSFINFIS	SSEARKFLTK	ENDINDIKKY	IHPLTIDYII	
SaNaMNAT	(142)	--NAMI	AIQI ----PRVDIS	STMIRQVSE	GKSIQ---	VL VPKSVENYIK	
PfNaMNAT	(195)	KYNLYD					
SaNaMNAT	(183)	GEGLYE-					

Abb. 3.11: Alignment des PfNaMNAT-Homologiemodells und der SaNaMNAT durch SWISS-MODEL.

Im Zuge der Modellierung der PfNaMNAT erstellte SWISS-MODEL ein Alignment der PfNaMNAT mit der SaNaMNAT, welches sich an den beiden Strukturmodellen orientiert. Bereiche, die innerhalb der Strukturmodelle als **Strang** oder **Helix** auftreten, sind farblich hervorgehoben. Für dieses Alignment wurde durch SIAS eine Sequenzidentität von 28 % und eine Sequenzähnlichkeit von 40 % berechnet.

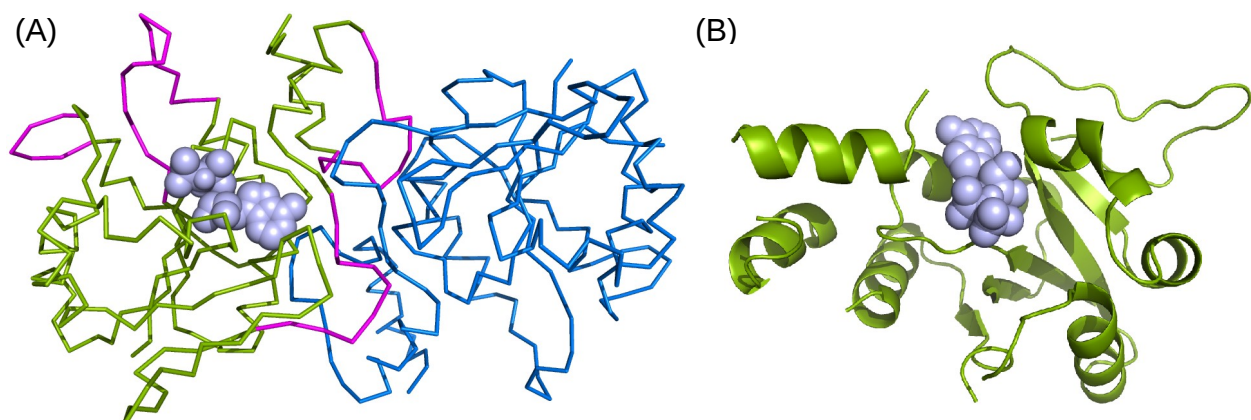


Abb. 3.12: Homologiemodell der PfNaMNAT.

Das Homologiemodell der PfNaMNAT basiert auf der Struktur 2H29 der *S. aureus* NaMNAT. Die SaNaMNAT bildet einen funktionellen Dimer. Dies wurde auf das Homologiemodell, hier in der Darstellung des Proteinrückgrates, übertragen (A). Innerhalb des Modells wurden einige flexible Loops, welche teilweise Kollisionen im Dimer hervorrufen, entfernt (pinke Bereiche). Für das letztendliche Modell wurden nur die grünen Bereiche beibehalten (A und B). Das ATP-Derivat ApCpp ist als Kalottenmodell innerhalb des aktiven Zentrums gebunden. Die Abbildungen wurden mit PyMol generiert.

Das ursprüngliche Homologiemodell musste noch überarbeitet werden. Da es sich bei der aus *S. aureus* stammenden NaMNAT um ein Dimer handelt [111], wurde die Dimerisierungskontaktflächen auf sterische Kollisionen untersucht. Auch in weiteren Bereichen des Proteinmodells konnten einige Loops identifiziert werden, deren Modellierungsqualität zweifelhaft war. All diese Loops wurden entfernt, es sind dies I40-H53, D78-H82, N156-N164 und N179-H189. Das so erhaltene Modell (Abb. 3.12 B) diente als Suchmuster zur Bestimmung der Rotation und Translation innerhalb des Patterson-Raums, um so eine Phaseninformation zu erhalten.

Im Laufe des Verfeinerungsprozesses wurde letztlich noch die Struktur des ATP-Derivats ApCpp mit einbezogen, da jede Zusatzinformation in einer verbesserten Elektronendichte resultiert. Hiervon ausgehend wurde ein iterativer Verfeinerungsprozess, aus Berechnung einer Elektronendichte und Anpassung des Strukturmodells an diese Dichte, angestoßen. Zur Berechnung des R_{free} -Wertes wurden 10 % der Reflexe aus dem Datensatz exkludiert. Trotz vielfacher Versuche pendelte der R_{free} -Wert immer um 50 %. Auch der Test verschiedener Lösungsvorschläge zur Positionierung des Modells innerhalb des Patterson-Raumes sowie die Nutzung von Phenix und CNS zur Bestimmung der Phase erbrachten keinen Durchbruch.

3.2.2.8 Generierung eines zweiten Proteinkristalls

Da sich der erste Versuch die Struktur der PfNaMNAT zu bestimmen als äußerst schwierig erwies, wurde beschlossen einen weiteren Kristall des Proteins zu züchten. Im Verlauf des Versuchs die Struktur zu bestimmen war aufgefallen, dass einige NaMNAT-Strukturen anderer Organismen ein Produktmolekül im aktiven Zentrum gebunden haben (z.B. 2H29, 3E27, 1KQO). Die optimierten *screens* zur Kristallisation von PfNaMNAT sollten nun noch einmal mit

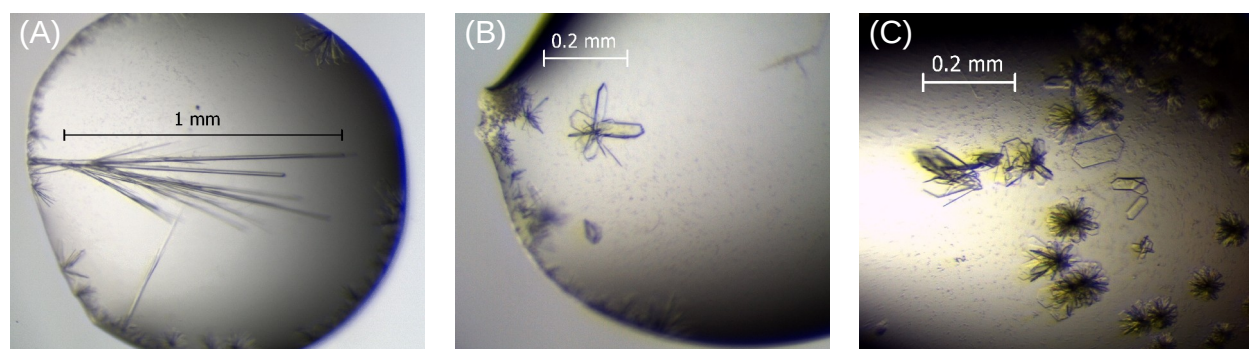


Abb. 3.13: Durch den Zusatz von NaAD erhaltene PfNaMNAT-Kristalle.

Der Zusatz von NaAD erbrachte nicht nur stabförmige Kristalle, sondern auch schild- respektive plattenförmige. Tatsächlich wurde ein Datensatz mit dem Kristall aus (C) aufgenommen. (A) HDR-Aufnahme. Bedingung: 16 mg/ml NaMNAT in 50 mM HEPES pH 7,8, 150 mM NaCl, Fällungsmittel: 0,15 M Bicine pH 8,2, 19 % PEG 6000. (B) Bedingung: 12 mg/ml NaMNAT in 50 mM HEPES pH 7,8, 150 mM NaCl, Fällungsmittel: 0,1 M Bicine pH 8,2, 18 % PEG 6000. (C) wie (B) jedoch 16 mg/ml NaMNAT.

dem Zusatz von NaAD sowie NAD durchgeführt werden. Da neben ATP α S und ApCpp auch NaAD bereits in der Ausgangsbedingung (JCSG Core I A2) einen Treffer erzielt hatte, erschien es als vielversprechend, hier wiederum einen Proteinkristall zu erhalten. Kristallisationsansätze wurden mit 12 und 16 mg/ml NaMNAT erstellt und dem Zusatz von 4,8 respektive 6,4 mM NaAD oder NAD. In vielen Bedingungen konnten dabei Kristalle gefunden werden. Diese traten in zwei verschiedenen Formen auf (siehe Abb. 3.13). Mit dem Zusatz von NaAD konnten etwas bessere Kristalle vorgefunden werden. Die Datenerfassung erfolgte wiederum an einem Synchrotron, diesmal jedoch am SLS des Paul Scherrer Instituts.

3.2.2.9 Lösung der Kristallstruktur der PfNaMNAT und Evaluation der Modellqualität

Mit dem so erhaltenen Datensatz, der PfNaMNAT im Komplex mit NaAD zeigen sollte, wurde ein neuerlicher Versuch unternommen die Struktur des Proteins zu bestimmen. Wiederum sollte dies über Molekularen Ersatz erfolgen. Die Beugungsdaten selbst waren bis zu einer Auflösung von 2,2 Å gegeben, wobei die Auflösung durch Aufnahme eines zweiten Datensatzes mit verkürztem Detektorabstand noch hätte erhöht werden können. Die Prozessierung der Beugungsdaten erfolgte mit XDS, wobei die Raumgruppe P1 gefunden wurde. Die Berechnung des R_{free} -Wertes sollte im Weiteren durch die Reservierung von 6 % der Reflexe ermöglicht werden. Eine Lösung der Phaseninformation wurde wiederum mit dem ursprünglichen Homologiemodell (siehe Abb. 3.12) gesucht. Ein Durchbruch gelang erst, als verschiedene Positionsverschiebungen von Aminosäuren sowie gänzlich fehlerhafte Bereiche innerhalb des Homologiemodells identifiziert werden konnten. Schließlich war es möglich, den Verfeinerungsprozess vollständig zu durchlaufen und die Struktur der PfNaMNAT zu bestimmen. Erleichtert wurde die Lösung des Phasenproblems dadurch, dass ein anderes Substrat innerhalb des aktiven Zentrums gebunden war. Dieses führte zu einer rigideren Konformation des Proteins und damit einhergehend einer besser definierten Elektronendichte. Bei der Suche nach einer korrekten Rotation und Translation des Suchmodells konnten beide Moleküle gefunden werden. Die Raumgruppe P1 ergab sich, da die beiden Moleküle nicht durch eine kristallographische Symmetrie korreliert waren.

Im Verlauf des iterativen Verfeinerungsprozesses wurde das ursprüngliche Homologiemodell respektive Suchmodell signifikant überarbeitet und an die gegebene Elektronendichte adaptiert. Innerhalb dieses Wechselspiels aus Verbesserung des Modells und computergestützter Optimierung der Elektronendichte, durch angepasste Phaseninformation, konnten die Qualitätsmerkmale R_{work} und R_{free} kontinuierlich verbessert werden. Zum Zeitpunkt des Schreibens dieser Arbeit liegen R_{work} bei 17,95 % und R_{free} bei 23,02 % (siehe Tab. 2). Als weiteres Merkmal zur Maximierung der Qualität des Modells wurde auf die chemischen

Realitäten geachtet. Hierzu zählen die Minimierung von sterischen Kollisionen, Berücksichtigung der Rotationswinkel ϕ und ψ (siehe Ramachandran-Plot in Abb. 3.14), Überprüfung der Rotamerkonformationen der einzelnen Seitenketten und Abweichung des β -Kohlenstoffatoms von der Idealposition (siehe Tab. 3). Getestet wurde dies mit dem Programm MolProbity [125][126]. Mit den erzielten Qualitätswerten kann die Struktur als vollständig gelöst angesehen werden und hat Publikationsqualität erreicht. Bis zu einer finalen Veröffentlichung sind höchstens noch minimalste Korrekturen zu erwarten, sofern überhaupt noch Anpassungen vorgenommen werden sollten.

Da über die gelöste Struktur des NaAD haltigen Modells nun ein hochwertiges Suchmodell zur Verfügung stand, wurde ein neuerlicher Versuch unternommen den ersten Datensatz, welcher PfNaMNAT im Komplex mit APC zeigen sollte, zu lösen. Innerhalb der Translations- und Rotationssuche im Patterson-Raum konnte eine eindeutige Lösung gefunden werden. Diese stimmte sogar mit dem ersten Lösungsvorschlag überein (siehe Kapitel 3.2.2.7). Da das letztlich erhaltene Strukturmodell jedoch in größeren Bereichen von dem ursprünglichen Homologiemodell abweicht war es initial nicht möglich genügend korrekte Informationen aus der Elektronendichte abzuleiten um das Homologiemodell adäquat anpassen zu können. Außerdem weisen beide Kristalle, also mit NaAD oder APC, verschiedene Raumgruppen auf (siehe Tab. 1). Der NaAD-Kristall gehört zur triklinen Raumgruppe P 1, der APC-Kristall dagegen zur monoklinen Raumgruppe P 1 2₁ 1. Obwohl beide Kristalle zwei NaMNAT-Moleküle in ihrer Raumgruppe beinhalten, ergibt sich jedoch durch die Schraubenachse der Raumgruppe P 1 2₁ 1 eine andere asymmetrische Einheit, welche nur ein Protein beinhaltet. Die Raumgruppe P 1 des NaAD-Kristalls beinhaltet dagegen zwei Proteine, die nicht durch eine kristallographische Symmetrie ineinander zu überführen wären. Raumgruppe und asymmetrische Einheit sind hier somit kongruent.

Tab. 1: Raumgruppen der beiden PfNaMNAT-Kristalle.

NaMNAT mit Raumgruppe		a (Å)	b (Å)	c (Å)	α	β	γ	Typ
NaAD	P 1	38,97	52,11	61,25	93,94	90,00	109,85	triklin
APC	P 1 2 ₁ 1	55,24	38,92	62,71	90,00	113,54	90,00	monoklin

Auch für die APC-haltige Struktur wurde der Verfeinerungsprozess angestoßen. Elektronendichte und Modell konnten hierbei, verglichen mit dem ersten Verfeinerungsprozess, rasch aneinander angepasst werden. Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit liegen R_{work} bei 24,35 % und R_{free} bei 29,49 % (siehe Tab. 2). Ebenso findet die Überprüfung mit MolProbity noch einige Abweichungen von den Idealwerten (siehe Tab. 3). Das Strukturmodell der APC-Struktur hat also noch nicht die Qualität der NaAD-Struktur erreicht. Bis zu einer finalen Veröffentlichung werden daher noch einige weitere Verfeinerungszyklen erfolgen müssen. Für eine vorläufige

Auswertung ist die Qualität des Modells jedoch mehr als hinreichend. Weitere Modifikationen werden daher nur in Nuancen auftreten, wie Anpassung der Roationswinkel ϕ und ψ sowie Rotamerkonformationen. Von letzterem werden eher oberflächliche Aminosäuren betroffen sein, weniger dagegen der Bereich des aktiven Zentrums. Ein Vergleich der beiden PfNaMNAT-Strukturen ist daher bereits bedenkenlos möglich. Hierbei fällt bereits auf, dass die APC-Struktur keine hinreichende Elektronendichte für die Aminosäuren 44 bis 47 aufweist, um den Bereich dieses Loops darstellen zu können. Die Elektronendichte der NaAD-Struktur ist bis auf die ersten Aminosäuren des N-Terminus klar definiert.

Tab. 2: Für die Verfeinerung der beiden PfNaMNAT-Strukturen genutzte Datensätze.

PfNaMNAT mit NaAD				PfNaMNAT mit APC			
Auflösung (Å)	Vollständigkeit	R _{work}	R _{free}	Auflösung (Å)	Vollständigkeit	R _{work}	R _{free}
39,6098 – 4,3986	95 %	17,09	20,73	32,2330 – 3,7602	98 %	18,55	23,57
4,3986 – 3,4920	94 %	16,34	19,54	3,7602 – 2,9853	98 %	21,88	27,45
3,4920 – 3,0508	93 %	17,64	24,85	2,9853 – 2,6081	98 %	28,37	34,10
3,0508 – 2,7719	94 %	18,66	25,73	2,6081 – 2,3697	99 %	38,26	44,46
2,7719 – 2,5733	93 %	18,69	23,10	2,3697 – 2,1999	98 %	45,47	45,41
2,5733 – 2,4216	90 %	20,04	27,12				
2,4216 – 2,3003	63 %	21,32	29,66				
2,3003 – 2,2002	44 %	24,98	35,79				
Σ				Σ			
39,6098 – 2,2002	83 %	17,95	23,02	32,2330 – 2,1999	98 %	24,35	29,49
Zahl der Reflexe	Testreflexe			Zahl der Reflexe	Testreflexe		
19086	1144 (6 %)			12481	762 (6 %)		

Tab. 3: MolProbity Statistik der beiden PfNaMNAT-Modelle.

	PfNaMNAT mit NaAD	PfNaMNAT mit APC
All-Atom Clashscore	8,71	11,84
Ramachandran-Plot		
Außreißer:	0,00 %	1,02 %
Erlaubt:	1,48 %	5,08 %
Bevorzugt:	98,52 %	93,91 %
Rotamer Ausreißer	2,30 %	2,60 %
C- β Abweichungen	0	0

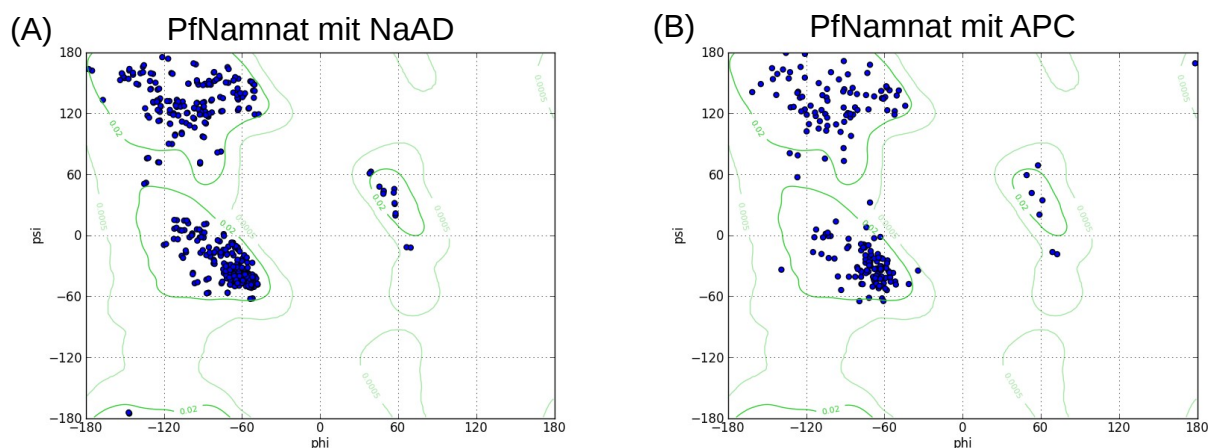


Abb. 3.14: Ramachandran-Plot der beiden PfNaMNAT-Strukturmodelle.

Beide PfNaMNAT-Strukturen wurden bezüglich der Verteilung ihrer ϕ - und ψ -Winkel untersucht. Es lässt sich die typische gehäufte Verteilung auf Bereiche für β -Stränge und α -Helices erkennen. Einige wenige Aminosäuren zeigen auch die Konformation einer linksgängigen Helix. Die Verteilung der Winkelkombinationen ist für beide Modelle sehr ähnlich und viele Aminosäuren weisen in beiden Plots einen äquivalenten Partner auf. In der APC-haltigen Struktur finden sich jedoch noch mehr Abweichungen von den Idealwerten, die noch einer weiteren Bearbeitung bedürfen. Da die NaAD-haltige Struktur aus zwei Modellen in der asymmetrischen Einheit besteht, tritt jede Aminosäure doppelt auf. Dies zeigt sich anhand nahezu kongruenter Doppelpunkte. Die grünen Linien weisen ideale und erlaubte Bereiche des Ramachandran-Plots aus (ausgenommen Glycin, Prolin und prä-Prolin). Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt.

Im Ramachandranplot zeigen beide Strukturmodelle der PfNaMNAT eine sehr ähnliche Verteilung der Aminosäuren (siehe Abb. 3.14). Es lässt sich die typische Akkumulation der Aminosäuren auf die drei erlaubten Bereiche des Ramachandran-Plots erkennen, die für α -Helices, β -Stränge und linksgängige Helices stehen. Da die NaAD-haltige NaMNAT-Struktur die komplette Einheitszelle beinhaltet (und keine verkleinerte asymmetrische Einheit) sind hier die Aminosäuren beider Moleküle repräsentiert. Die Anzahl der Punkte ist daher verdoppelt. Da es sich jedoch um zwei identische Proteine handelt, sind auch die ϕ - und ψ -Winkel äquivalenter Aminosäuren identisch. Es ergeben sich kongruente oder nur leicht versetzte Punkte. Insbesondere im Bereich der α -Helix weist die NaAD-haltige Struktur weniger Verletzungen auf, als ihr APC-haltiges Gegenstück. Dies korrespondiert mit dem gegenwärtigen Verfeinerungsstadium der beiden Strukturen.

Die Temperaturfaktoren, auch B-Faktoren genannt, der beiden PfNaMNAT-Modelle sind in Abb. 3.15 repräsentiert. Die Stickdarstellung lässt nicht nur die Hauptkette sondern auch die Seitenketten klar erkennen. Die B-Faktoren sind nicht nur ein Indikator für Bereiche des Proteins, denen eine hohe Beweglichkeit zu eigen ist, sie sind darüber hinaus auch ein Qualitätsmerkmal. Erwartungsgemäß treten im Inneren des Proteins niedrige Temperaturfaktoren auf. Diese Bereiche sollten durch Sekundärstruktur motive und damit einhergehend Stabilisierung durch nicht kovalente Wechselwirkungen, eine geringe Beweglichkeit aufweisen. Oberflächliche Aminosäuren in Loops oder auch solche mit langen flexiblen Seitenketten zeigen dagegen eine

etwas erhöhte Beweglichkeit. Dies ist mit den beobachteten B-Faktoren konsistent. Der Großteil des Modells ist also in wohldefinierten, rigiden Strukturen geordnet. Der Bereich 44 bis 47, der im APC-haltigen Modell keine hinreichende Elektronendichte für eine Darstellung der Aminosäuren aufweist, zeigt ebenfalls hohe B-Faktoren in der NaAD-haltigen Struktur. Dieser Bereich ist in Abb. 3.15 (B) als roter Loop auf der linken Seite zu erkennen. Die Elektronendichte ist in diesem Bereich auch in der NaAD-Struktur weniger gut ausgeprägt. All dies weist auf eine hohe Beweglichkeit dieses Loops hin. Später soll hierauf noch genauer eingegangen werden.

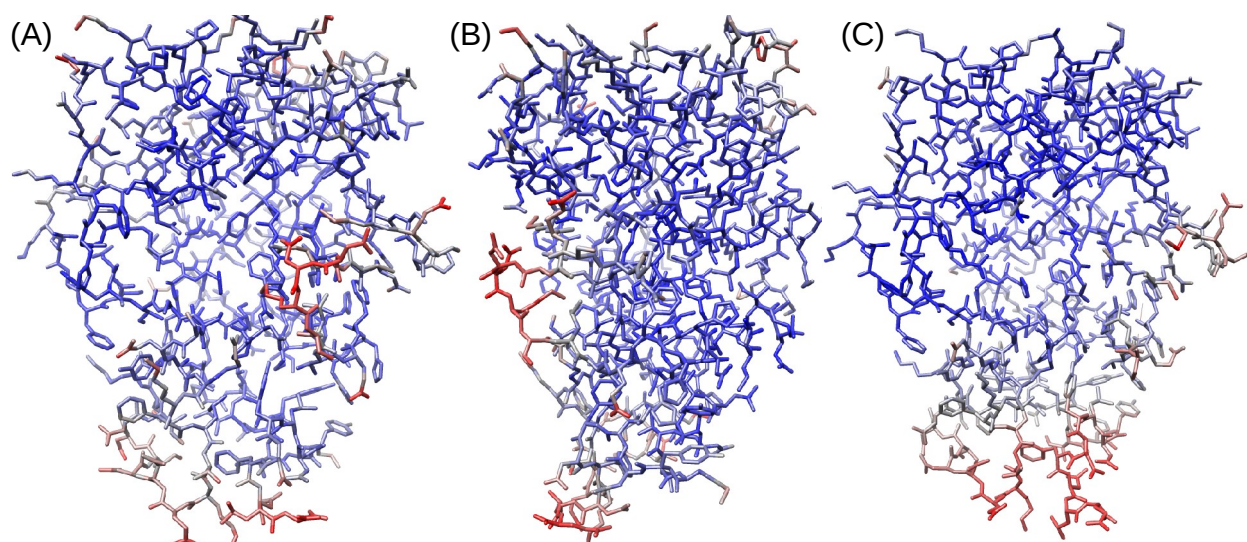


Abb. 3.15: Stickdarstellung der PfNaMNAT mit Colorierung der B-Faktoren.

Die Farbgebung der Stickdarstellung ist hier an die B-Faktoren adaptiert. Bereiche mit niedrigen B-Faktoren sind blau repräsentiert, verlaufen über einen Grauton und wechselt schließlich in rot für Bereiche mit hohen B-Faktoren. Das NaAD-haltige Modell ist vollständig zu erkennen (A), wobei es einmal um 90 ° nach links gedreht wurde (B). Dem APC-haltigen Modell der PfNaMNAT (C) fehlt dagegen der Bereich der Aminosäuren 44 bis 47. Die Blickrichtungen sind bei (A) und (C) nahezu identisch. Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt.

Eng verknüpft mit den Temperaturfaktoren ist auch die Besetzung (engl. *occupancy*) der einzelnen Atompositionen. Häufig lassen sich für sehr bewegliche Seitenketten, bei einer genügend hohen Auflösung (ca. 1,6 Å), alternative Konformationen erkennen. Für beide PfNaMNAT-Strukturen wurden alle Atompositionen, sofern darstellbar, als vollständig besetzt modelliert.

Die R-Werte stellen eine praktikable Kenngröße zur Abschätzung der Qualität eines Proteinmodells dar. Nicht weniger interessant ist auch ein direkter Blick auf die Elektronendichte und ihre Entwicklung im Verlauf der Strukturmodellierung (siehe Abb. 3.16). Zu Beginn des Verfeinerungsprozesses ist nur eine grobe Anpassung von Modell und Elektronendichte gegeben (Abb. 3.16 (A)). In einigen Regionen ist Dichte gegeben, wo sie nicht sein dürfte, in anderen

Regionen fehlt sie dagegen. Erstaunlich ist dabei jedoch die bereits relativ gute Anpassung von Dichte und Modell, obwohl es sich bei dem gezeigten Stand um den anfänglich abgebrochenen Verfeinerungsprozess handelt. Letztlich konnte jedoch für beide Modelle, APC-haltig sowie NaAD-haltig, eine sehr gute Angleichung von Modell und Elektronendichte erzielt werden (siehe Abb. 3.16 (B) und (C)).

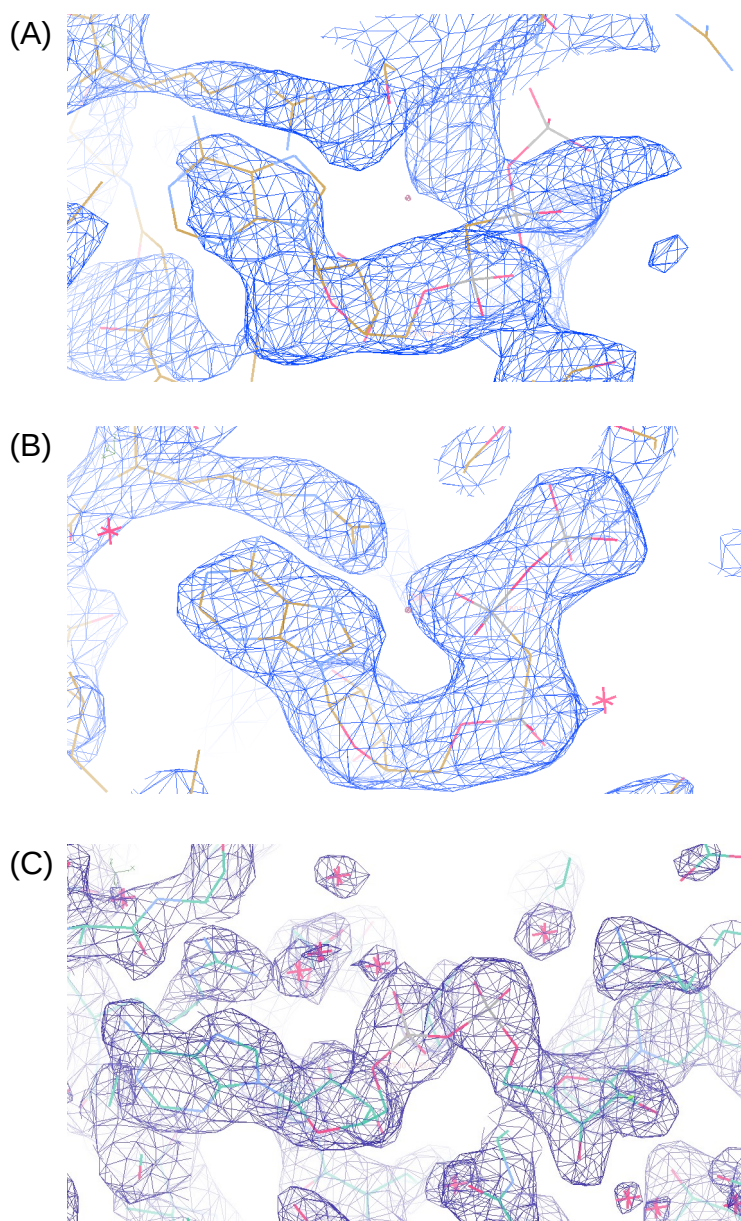


Abb. 3.16: Entwicklung der Elektronendichte während des Verfeinerungsprozesses.

Alle drei Abbildungen konzentrieren sich auf den Bereich des aktiven Zentrums. (A) und (B) haben APC gebunden, (C) dagegen NaAD. Zum gegenwärtigen Stand der Verfeinerung – (B) und (C) – umschließt die Elektronendichte, das Strukturmodell passgenau. Die drei $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Karten sind mit einer Ausdehnung von 1,5 Sigma dargestellt. Die Abbildungen wurden mit Coot erstellt.

3.2.3 Die Struktur der PfNamnat

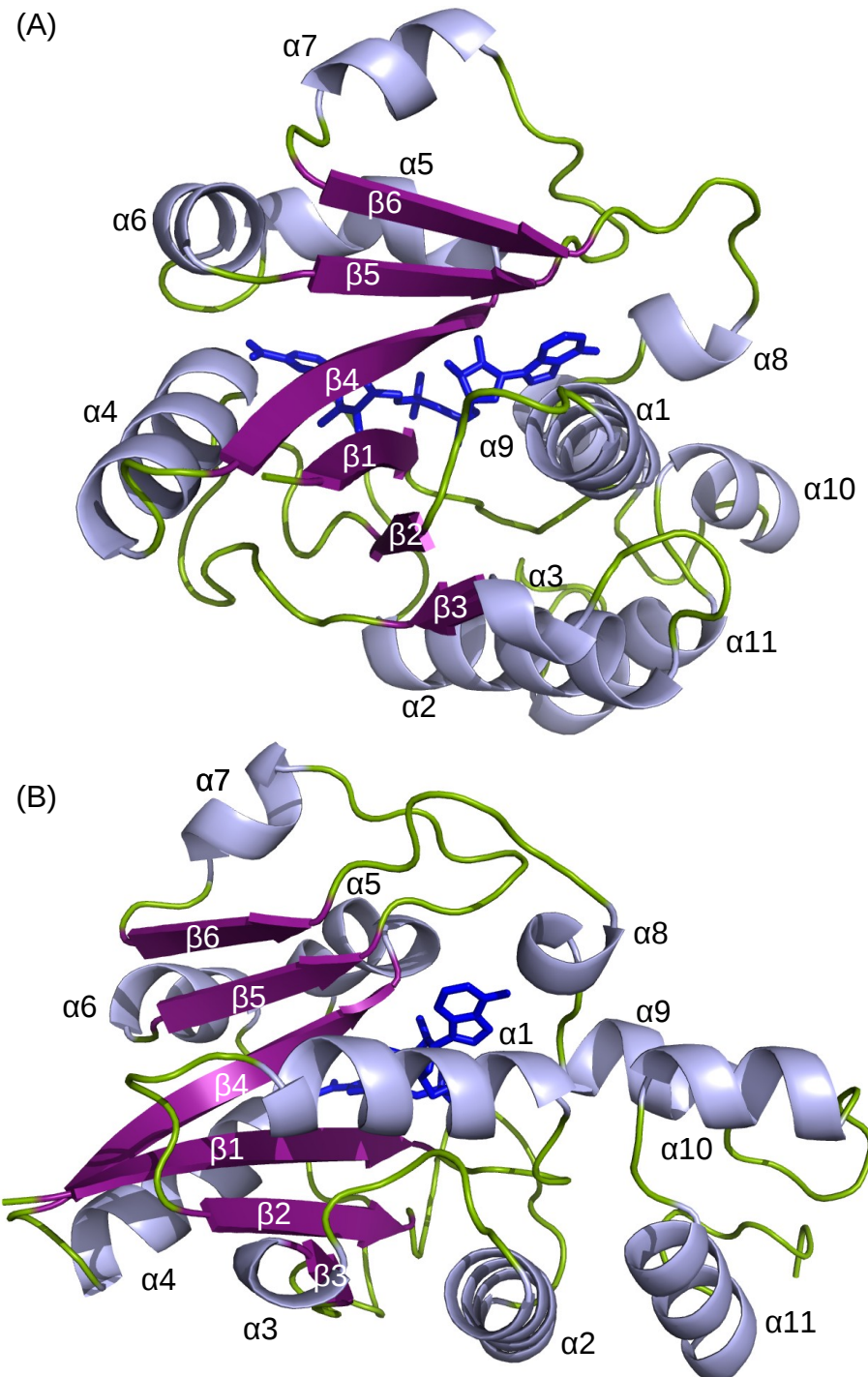


Abb. 3.17: Übersichtsstruktur des PfNaMNAT-NaAD Komplexes.

In der Abbildung ist die Sekundärstruktur der PfNaMNAT hervorgehoben. Bereiche, die nicht Teil einer α -Helix oder eines β -Strangs sind, sind grün gefärbt. Die Helices sowie β -Stränge sind von N- zu C-Terminus durchnummeriert. Das Produkt NaAD ist in einer blau eingefärbten Stickdarstellung zu erkennen. (B) ist gegenüber (A) entlang der Horizontalen um 90° nach links gedreht. Der N-Terminus befindet sich direkt vor dem Strang $\beta 1$, der C-Terminus folgt auf Helix $\alpha 11$. Die Abbildung wurde mit PyMol erstellt.

3.2.3.1 Die Sekundärstruktur der PfNaMNAT

Ist die Struktur eines Proteins erst einmal gelöst, gilt es die Verteilung der Sekundärstruktur motive des Proteins zu identifizieren. Eine objektive Zuweisung der Sekundärstruktur anhand der Proteinstruktur gilt jedoch noch als ungelöstes Problem. Die Festlegung der Grenzen zwischen Helices, Strängen und Kehren ist partiell willkürlich und einheitliche Standards sind nicht existent [127]. Auch wenn die Kenntnis der Sekundärstruktur nicht von Nöten ist, um die biologische Funktion eines Proteins zu klären, so ist sie jedoch hilfreich, um Supersekundärstruktur motive eines Proteins zu identifizieren und spätestens wünschenswert, wenn es um eine einheitliche Darstellung einer Proteinstruktur geht oder auch um den Vergleich homologer Strukturen [128]. Verschiedene computergestützte Verfahren wurden entwickelt, welche eine automatische Zuweisung der Sekundärstruktur durchführen. Als *de facto* Standard kann jedoch der von Kabsch und Sander entwickelte DSSP-Algorithmus (*Dictionary of Protein Secondary Structure*) angesehen werden [129][128]. Jedoch sind auch die verschiedenen Algorithmen zum Bestimmen der Sekundärstruktur nicht perfekt. Nicht ideale Konfigurationen des Proteinrückgrates ergeben Doppeldeutigkeiten. Dies resultiert in teilweise divergenten Ergebnissen der einzelnen Programme [127]. Daher wurde die Struktur der PfNaMNAT einer manuellen Korrektur unterzogen. Diese soll hier vorgestellt werden.

Zur Evaluation der Struktur kann man dabei ϕ - und ψ -Winkel der jeweiligen Aminosäure auswerten, Positionen der $C\alpha$ -Atome, die Verteilung von Wasserstoffbrückenbindungen und allgemein die Geometrie des Rückgrates betrachten. Um dies jedoch nicht für alle Aminosäuren durchführen zu müssen, erfolgte zunächst eine automatische Zuweisung der Sekundärstruktur motive. Hierfür wurde die PDB-Datei der PfNaMNAT (A-Kette der NaAD-haltigen Struktur) mit DSSP (Version 2.0.4 Linux AMD 64) ausgewertet und schließlich eine korrespondierende PDB-Datei inklusive der Sekundärstrukturinformation mittels dssp2pdb (Version 0.04) erstellt. Für 3_{10} -Helices und π -Helices wurde jeweils eine separate Datei erstellt. Außerdem wurden die automatischen Zuweisungsmechanismen der Programme PyMol und Chimera herangezogen und ausgewertet. Chimera greift dabei selbst auf den DSSP-Algorithmus zurück (Voreinstellungen: -0,5 *H-bond energy cutoff* (kcal/mol), *minumum helix length* 3, *minimum strand length* 3). Die Ergebnisse zu DSSP weichen jedoch leicht voneinander ab. Dies könnte evtl. durch unterschiedliche Implementierungen des Algorithmus bedingt sein. PyMol nutzt einen eigenen Algorithmus. Über den Befehl dss (*define secondary structure*) wird – laut PyMol-Wiki – basierend auf der Geometrie des Rückgrats und dem Wasserstoffbrückenbindungsmuster die Sekundärstruktur zugewiesen. Mit den Ergebnissen dieser verschiedenen Verfahren wurde ein Alignment erstellt, um einen Vergleich vornehmen zu können (siehe Abb. 3.18).

		$\beta 1$	$\alpha 1$	$\beta 2$		
DSSP 35	(3)	HKNICIIYGG	SFDPITYAH	EMVLDKIS	NLNWIHEI	WVVICRCRNDKSLTEFHH
DSSP 3	(3)	HKNICIIYGG	SFDPITYAH	EMVLDKIS	NLNWIHEI	WVVICRCRNDKSLTEFHH
DSSP 5	(3)	HKNICIIYGG	SFDPITYAH	EMVLDKIS	NLNWIHEI	WVVICRCRNDKSLTEFHH
DSSP	(3)	HKNICIIYGG	SFDPITYAH	EMVLDKIS	NLNWIHEI	WVVICRCRNDKSLTEFHH
Chimera DSSP	(3)	HKNICIIYGG	SFDPITYAH	EMVLDKIS	NLNWIHEI	WVVICRCRNDKSLTEFHH
Pymol dss	(3)	HKNICIIYGG	SFDPITYAH	EMVLDKIS	NLNWIHEI	WVVICRCRNDKSLTEFHH
Manuell 3 10	(3)	HKNICIIYGG	SFDPITYAH	EMVLDKIS	NLNWIHEI	WVVICRCRNDKSLTEFHH
		$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\beta 3$	$\alpha 4$	$\beta 4$
DSSP 35	(55)	RHNMFTIIINN	SSKIIKSK	IFLKDLESHSEMTPT	TYDLLKTQKELHPN	YTFYF
DSSP 3	(55)	RHNMFTIIINN	SSKIIKSK	IFLKDLESHSEMTPT	TYDLLKTQKELHPN	YTFYF
DSSP 5	(55)	RHNMFTIIINN	SSKIIKSK	IFLKDLESHSEMTPT	TYDLLKTQKELHPN	YTFYF
DSSP	(55)	RHNMFTIIINN	SSKIIKSK	IFLKDLESHSEMTPT	TYDLLKTQKELHPN	YTFYF
Chimera DSSP	(55)	RHNMFTIIINN	SSKIIKSK	IFLKDLESHSEMTPT	TYDLLKTQKELHPN	YTFYF
Pymol dss	(55)	RHNMFTIIINN	SSKIIKSK	IFLKDLESHSEMTPT	TYDLLKTQKELHPN	YTFYF
Manuell 3 10	(55)	RHNMFTIIINN	SSKIIKSK	IFLKDLESHSEMTPT	TYDLLKTQKELHPN	YTFYF
		$\alpha 5$	$\alpha 6$	$\beta 5$	$\alpha 7$	$\beta 6$
DSSP 35	(107)	GLGSDLICDIFS	WDEGEKLVLE	NAFIIIERGHFKID	ESILKKFP	KYYLINIP
DSSP 3	(107)	GLGSDLICDIFS	WDEGEKLVLE	NAFIIIERGHFKID	ESILKKFP	KYYLINIP
DSSP 5	(107)	GLGSDLICDIFS	WDEGEKLVLE	NAFIIIERGHFKID	ESILKKFP	KYYLINIP
DSSP	(107)	GLGSDLICDIFS	WDEGEKLVLE	NAFIIIERGHFKID	ESILKKFP	KYYLINIP
Chimera DSSP	(107)	GLGSDLICDIFS	WDEGEKLVLE	NAFIIIERGHFKID	ESILKKFP	KYYLINIP
Pymol dss	(107)	GLGSDLICDIFS	WDEGEKLVLE	NAFIIIERGHFKID	ESILKKFP	KYYLINIP
Manuell 3 10	(107)	GLGSDLICDIFS	WDEGEKLVLE	NAFIIIERGHFKID	ESILKKFP	KYYLINIP
		$\alpha 8$	$\alpha 9$	$\alpha 10$	$\alpha 11$	
DSSP 35	(159)	KLSFINFIS	SSEARKFLT	KENDINDI	KKYIHPLTIDYIIKYN	LYDFNLE
DSSP 3	(159)	KLSFINFIS	SSEARKFLT	KENDINDI	KKYIHPLTIDYIIKYN	LYDFNLE
DSSP 5	(159)	KLSFINFIS	SSEARKFLT	KENDINDI	KKYIHPLTIDYIIKYN	LYDFNLE
DSSP	(159)	KLSFINFIS	SSEARKFLT	KENDINDI	KKYIHPLTIDYIIKYN	LYDFNLE
Chimera DSSP	(159)	KLSFINFIS	SSEARKFLT	KENDINDI	KKYIHPLTIDYIIKYN	LYDFNLE
Pymol dss	(159)	KLSFINFIS	SSEARKFLT	KENDINDI	KKYIHPLTIDYIIKYN	LYDFNLE
Manuell 3 10	(159)	KLSFINFIS	SSEARKFLT	KENDINDI	KKYIHPLTIDYIIKYN	LYDFNLE

Abb. 3.18: Alignment der PfNaMNAT-Sekundärstruktur, welche durch verschiedene Verfahren bestimmt wurde.

Mit DSSP wurden verschiedene Sekundärstrukturmodule untersucht. Die Option 3 (von dssp2pdb) berücksichtigt dabei 3_{10} -Helices, Option 5 π -Helices und 35 beide Helixvarianten. PyMol sowie Chimera identifizieren standardmäßig ebenfalls beide Helixtypen. Durch den Farbcode werden α -Helices und β -Stränge hervorgehoben. Nur in der manuell überarbeiteten Darstellung sind 3_{10} -Helices als solche gesondert ausgewiesen.

Anhand dieses Alignments konnten Bereiche identifiziert werden, welche nicht eindeutig zuzuordnen sind. Deren Struktur wurde genauer untersucht und daran eine Zuordnung vorgenommen. Außerdem konnten durch die verschiedenen Alignments α -Helices, auch 3.6_{13} -Helix genannt, von 3_{10} -Helices unterschieden werden.

Eine Zuordnung der β -Stränge ist offensichtlich. Nur Tyr102 ist im Alignment nicht eindeutig. Die Konformation des Rückgrates ($\varphi = -95^\circ$, $\psi = 151^\circ$) entspricht jedoch einem β -Strang. Da diese Aminosäure jedoch im Endbereich zweier paralleler β -Stränge liegt, kann sie keine H-Brücke (Wasserstoffbrücke) zu einer gegenüberliegenden Aminosäure ausbilden. Stabilisierend

wirkt jedoch eine H-Brücke zwischen der para-Hydroxylgruppe und ϵ -Aminogruppe von Lys4. Tyr102 wird als dem β -Strang zugehörig gezählt.

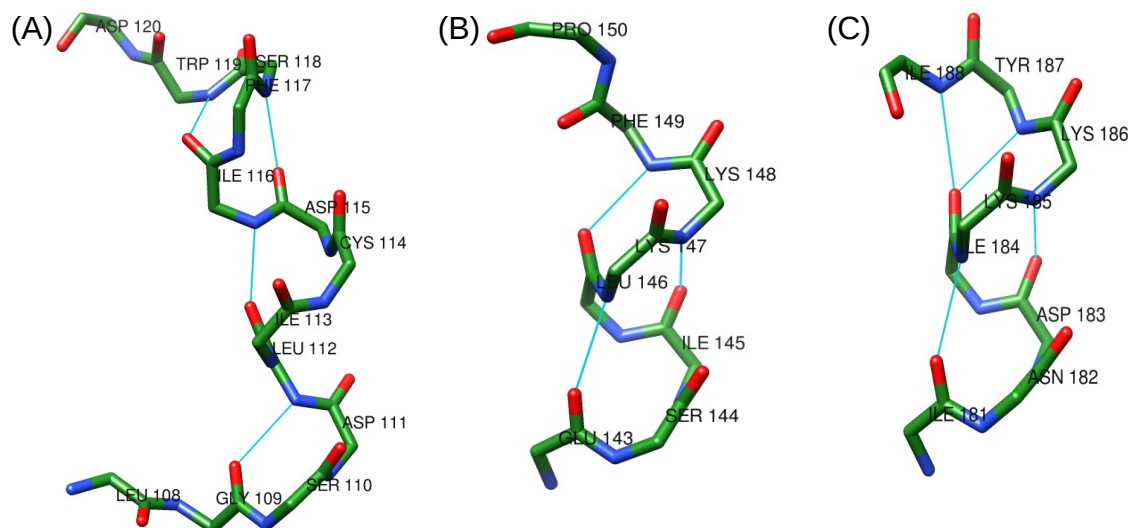


Abb. 3.19: Rückgrat einiger Helices der PfNaMNAT.

Die Helices $\alpha 5$ (A), $\alpha 7$ (B) und $\alpha 10$ (C) können automatisiert nicht eindeutig klassifiziert werden. Im Fall aller drei Helices ist eine Mischung aus 3_{10} -Helix oder auch β -turn und 3.6_{13} -Helix gegeben, die ineinander übergehen. Es handelt sich also um chimäre Strukturen, die zwar als Helices dargestellt werden, deren genauer Typ jedoch deutlich von einer idealen α -Helix abweicht. Die Betrachtung der H-Brücken (hellblau) erleichtert die Zuordnung der Helixtypen. Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt.

Schwieriger ist es dagegen, einige Helices anhand des Alignments eindeutig zuzuordnen. Diese strittigen Bereiche sollen einer genaueren Betrachtung unterzogen werden. Asn29 bildet das Ende einer α -Helix ($\alpha 1$). Die abschließende Windung, an welcher Asn29 beteiligt ist, bildet eine 3_{10} -Helix. Strittig ist dagegen der Bereich zwischen Ser110 und Ser118. Im Ramachandran-Plot liegen all diese Aminosäuren im Bereich der α -Helix. Um die tatsächlichen Gegebenheiten zu verstehen, muss man jedoch einen genaueren Blick auf die Konformation des Rückgrates werfen (siehe Abb. 3.19). Die gesamte Anordnung ähnelt einer Helix entfernt. Man kann diese Struktur so interpretieren, dass sie durch einen β -turn, ähnlich einer 3_{10} -Helix, eingeleitet wird und nur eine reguläre α -Helixwindung vollzieht bevor sie in einer 3_{10} -Helix endet. Zwecks einer konsistenten Darstellung mit anderen NaMNATs wurde dieser Bereich als Helix visualisiert.

Das Ende der Helix $\alpha 7$ bildet wieder eine 3_{10} -Helix, dies stellt sich ähnlich dar, wie das Ende der vorausgehenden Helix $\alpha 5$. Auch am Ende der Helix $\alpha 10$ liegt keine ideale Geometrie vor. Das hier keine ideale Helixgeometrie gegeben ist, kann man relativ deutlich am Verteilungsmuster der H-Brücken erkennen (siehe Abb. 3.19 (C)). Eine ideale H-Brücke wäre zwischen Ile184 und Tyr187 gegeben, was einer 3_{10} -Helix entspricht. Eine weitere, nicht ganz ideale, H-Brücke ist jedoch auch zu Ile188 möglich. Dies entspräche eher einer α -Helix. Es liegt also eine Art chimäre Struktur zwischen 3_{10} - und 3.6_{13} -Helix vor.

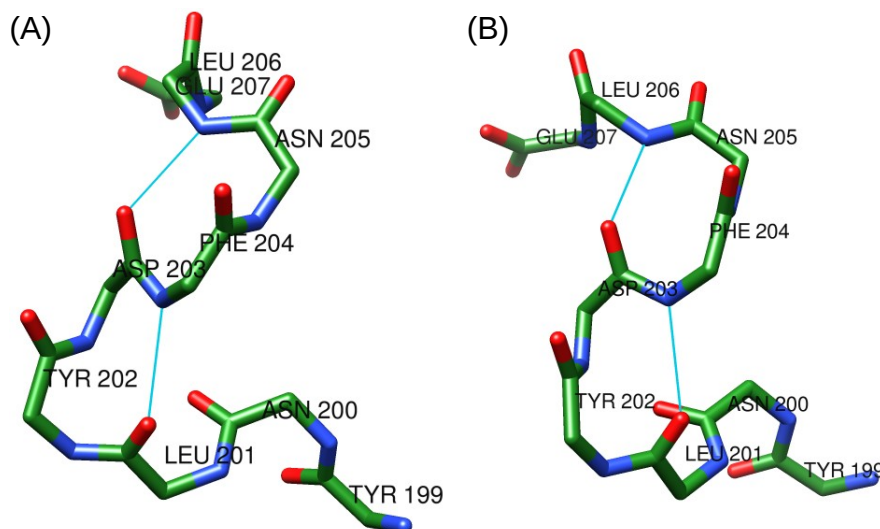


Abb. 3.20: Rückgrat des C-Terminus der PfNaMNAT.

DSSP schlägt für den C-Terminus der PfNaMNAT, hier in zwei verschiedenen Orientierungen, die einzelne Windung einer 3_{10} -Helix vor. Bei genauer Betrachtung ist dies jedoch nicht haltbar. Die Windung zwischen Leu201 und Asp203 wäre linksgängig. Viel eher sind hier zwei aufeinander folgende Kehren gegeben. Die Struktur stabilisierende H-Brücken sind in hellbau dargestellt. Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt.

Der letzte strittige Bereich findet sich am C-Terminus der PfNaMNAT. DSSP ordnet die drei Aminosäuren Leu201, Tyr202 und Asp203 als eine 3_{10} -Helix ein. Abb. 3.20 lässt erkennen, dass es sich hier jedoch, wenn überhaupt, um eine linksgängige Helix handelt. Im Ramachandran-Plot liegen die beiden Aminosäuren Tyr202 und Asp203 ebenfalls im Bereich einer linksgängigen Helix, Leu201 im Bereich eines β -Faltblattes. Eine sinnvollere Interpretation ist es jedoch, diesen Bereich als Loop einzuordnen, ebenso wie die nachfolgenden Aminosäuren Phe204 bis Leu206. Wobei Leu206 ebenfalls die Torsionswinkel einer linksgängigen Helix aufweist, die beiden anderen die Winkel einer rechtsgängigen Helix. Auch hier liegt somit ein Loop vor.

3.2.3.2 Supersekundärstrukturmotiv Rossmann-Falte

Zentrales Motiv der PfNaMNAT ist eine Rossmann-Falte [130]. Diese, auch als Dinukleotidbindefalte bekannte Struktur, ist charakteristisch für die Nukleotidyltransferase- α/β -phosphodiesterase Superfamilie. Sie besteht aus einem eng gewundenen β -Faltblatt, welches sechs parallel verlaufende β -Stränge aufweist. Diese folgen nicht etwa der Anordnung, die sich aus ihrer Sequenz ergibt, sondern weisen ein typisches Arrangement auf, es ist dies: 3-2-1-4-5-6 [131]. Diese Anordnung kann anhand des Strukturausschnittes und dem damit korrelierten topologischen Diagramm aus Abb. 3.21 nachvollzogen werden. Es lässt sich eine Dichotomie erkennen, wobei die Abfolge der ersten drei β -Stränge (3-2-1) durch einen langen Übergang – in diesem Fall repräsentiert durch Helix $\alpha 4$ – mit einer invertierten Abfolge der nächsten drei β -Stränge (4-5-6) verbunden wird.

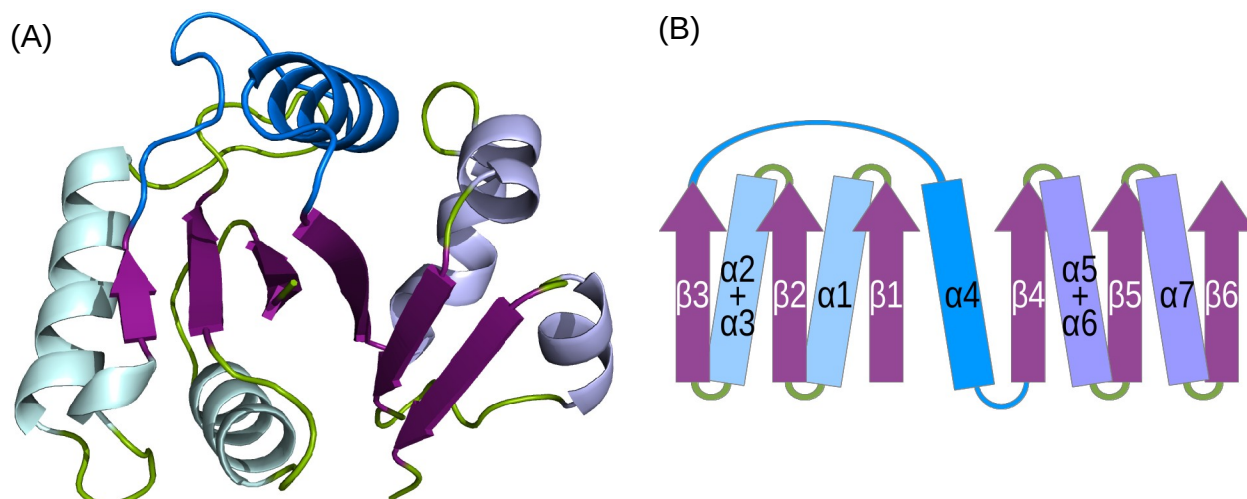


Abb. 3.21: Rossmann-Falte als Supersekundärstruktur der PfNaMNAT.

Durch die Fokussierung auf die Aminosäuren drei bis 157 tritt die Rossmann-Falte mit ihren sechs parallelen β -Strängen klar in den Vordergrund. Weitere C-terminale Aminosäuren sind nicht dargestellt. Die beiden Segmente der Rossmann-Falte sind sowohl in der Cartoondarstellung (A) als auch im topologischen Diagramm (B) durch die Farbcodierung ihrer Helices hervorgehoben. Verbunden sind sie durch den *topological switch point*, hier in dunkelblau. Das topologische Diagramm ist gegenüber der Cartoondarstellung um ca. 90° entlang der Horizontalen nach unten rotiert.

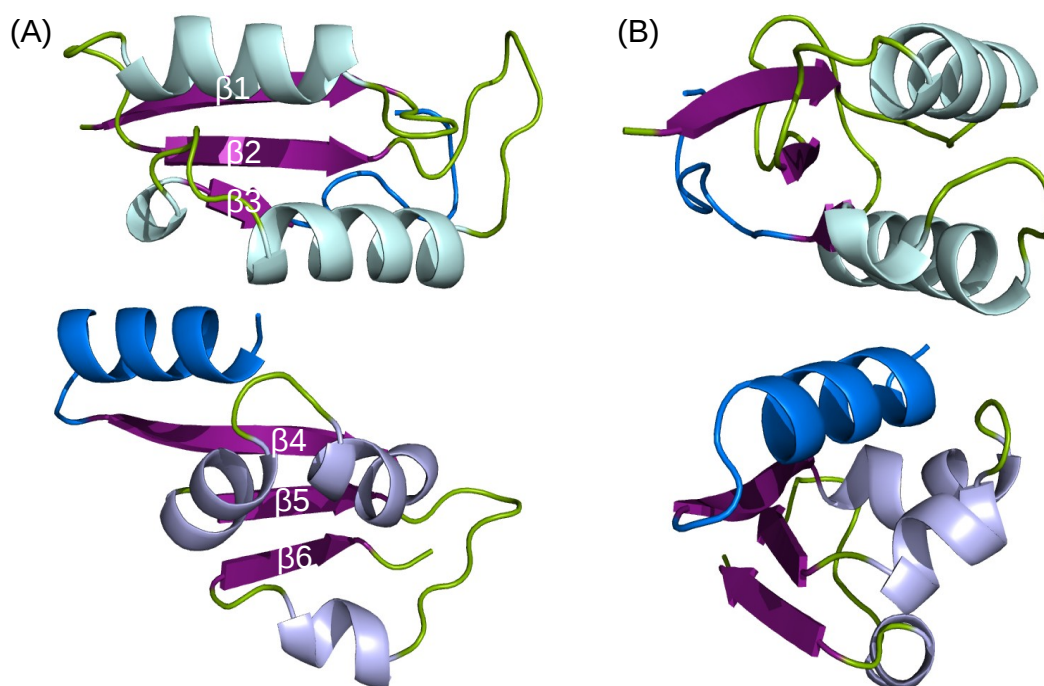


Abb. 3.22: Zerteilte Darstellung beider Segmente der Rossmann-Falte.

Durch die Zerteilung der Rossmann-Falte in ihrem topologischen Wendepunkt kann man beide $\beta\alpha\beta$ -Segmente in die gleiche Orientierung bringen. So wird ersichtlich, dass es sich in beiden Fällen um eine rechtsgängige Verbindung der β -Stränge miteinander handelt. Das obere Segment der Darstellung umfasst die Aminosäuren drei bis 86, das untere 87 bis 157. Der Farbcode wurde aus der vorausgehenden Abbildung übernommen. (B) ist gegenüber (A) entlang der Senkrechten um ca. 90° nach rechts gedreht.

Die Rossmann-Falte kann somit weiter unterteilt werden in zwei Segmente, denen jeweils die Struktur $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ zu eigen ist. Um eine Gegenüberstellung zu ermöglichen, sind beide Segmente in Abb. 3.22 voneinander getrennt und in gleicher Orientierung dargestellt. Aufeinander folgende β -Stränge sind dabei mittels eines rechtsgängigen Übergangs miteinander verbunden. D.h. β -Stränge, welche in der Darstellung oben sind, haben eine Verbindung von ihrem C-Terminus (rechts oben) zu dem N-Terminus (links unten) des nachfolgenden β -Stranges. Das topologische Diagramm aus Abb. 3.21 (B) gibt dies ebenfalls wieder. Die meisten Verbindungen paralleler β -Stränge weisen diese Chiralität auf [43].

Durch die Inversion der beiden Segmente (einmal 3-2-1 und dann 4-5-6), die jedoch jeweils rechtsgängig sind, folgt, dass die intervenierenden α -Helices einmal für das erste Segment unterhalb des sechssträngigen Faltblattes liegen und die α -Helices des nächsten Segments oberhalb des Faltblattes (siehe auch Abb. 3.21 A). Die Verbindung beider Segmente wird auch als *topological switch point* (topologischer Wendepunkt) bezeichnet.

3.2.3.3 Strukturvergleich der NaMNATs verschiedener Organismen identifiziert wichtige Motive der PfNaMNAT

Die Kenntnis der Struktur homologer Proteine ist bereits beim Lösen der Struktur hilfreich, zum Ableiten der Phasenwinkel und um sich an dem möglichen Verlauf des Proteinrückgrates in konservierten Bereichen zu orientieren. Da NaMNAT respektive die Nicotinamid präferierende Variante NMNAT eine zentrale Position innerhalb des NAD-Stoffwechsels spielen, wurde dieses Enzym bereits bei einer Vielzahl anderer Organismen strukturell untersucht. Hierzu zählen verschiedene Prokaryonten, wie *E. coli* [132], *Bacillus anthracis* [119][131][124], *Bacillus subtilis* [133], *Staphylococcus aureus* [120], *Pseudomonas aeruginosa* [134] sowie einige weitere. Aber auch die zwei Isoformen der humanen NMNAT-1 [135][136] und NMNAT-3 [137], teilweise auch Pnat-1 und Pnat-3 genannt, sind in ihrer Kristallstruktur bekannt. Tabelle 4 gibt einen Überblick zu verschiedenen bereits gelösten NaMNAT-Strukturen.

Die Kenntnis der Struktur verwandter Enzyme kann dabei helfen, konservierte Bereiche aber auch Besonderheiten innerhalb eines Proteins zu identifizieren. Die Überlagerung verschiedener Strukturen mit der PfNaMNAT (siehe Abb. 3.23) verdeutlicht bereits den hohen Konservierungsgrad der zugrunde liegenden Rossmann-Falte. Aus derartigen Strukturvergleichen ableitbare RMSD-Werte (siehe Tab. 5) sind ein Indikator für den Verwandtschaftsgrad zweier Proteine. Sie erlauben eine partielle Quantifizierung der Ähnlichkeit zweier Strukturen in einem Zahlenwert. Da es in homologen Strukturen naturgemäß Abweichung gibt, konnte nicht für alle 205 Aminosäuren der PfNaMNAT DND-Struktur eine äquivalente Aminosäure gefunden werden. Die Zahl der Aminosäure, auf denen die RMSD-Berechnung beruht, ist eben falls in Tab. 5 angegeben. Mittels eines sequenzbasierten Alignments (siehe Abb.

3.24) ist ein weiterer Vergleich der Enzyme möglich. Hierdurch können diejenigen Aminosäure identifiziert werden, die konserviert sind oder auch eine Besonderheit darstellen.

Tab. 4: Übersicht bereits beschriebener NaMNAT-Strukturen.

Sofern die jeweiligen Enzyme eine Substanz innerhalb ihres aktiven Zentrums gebunden haben, ist diese in Klammern hinter dem PDB-Code mit der Abkürzung angegeben, welche auch in der PDB genannt wird. NaAD wird oftmals als DND (Dinukleotid) oder NXX abgekürzt. Apo ist bei der Apo-Form angegeben. Die EcNaMNAT (1K4M) wurde tatsächlich mit NaAD kristallisiert [132], es liegt ein Fehler in der PDB-Datei vor.

Organismus	PDB-Code
<i>B. anthracis</i>	3DV2 (SO ₄), 2QTM (Apo), 2QTN (NCN = NaMN), 2QTR (NXX), 3E27(DND)
<i>B. subtilis</i>	1KAM (Apo), 1KAQ (DND)
<i>E. coli</i>	1K4K (Xe), 1K4M (NAD, tatsächlich NaAD)
<i>Francisella tularensis</i>	2R5W (Cl ⁻ , Mg ²⁺), 2QJT (AMP)
Humane NMNAT-1	1KQO (DND) 1KR2 (TAD = Tiazofurin), 1KQN (NAD), 1KKU (Apo)
Humane NMNAT-3	1NUP (NMN), 1NUR (SO ₄), 1NUQ (NXX), 1NUS (NMN, APC), 1NUT (APC), 1NUU (NAD)
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	1HYB (NMN), 1EJ2 (NAD), 1M8F (NAD), 1M8G (NAD), 1M8J (NAD), 1M8K (NAD)
<i>Methanococcus jannaschii</i>	1F9A (ATP)
<i>P. aeruginosa</i>	1YUN (ATP), 1YUL (Citrat), 1YUM (NCN = NaMN)
<i>S. aureus</i>	2H29 (DND), 2H2A (DND)
<i>Synechocystis</i> sp.	2QJO (APR, NAD, POP, SO ₄)

Tab. 5: Mit Coot berechnete RMSD-Werte der PfNaMNAT mit anderen NaMNATs.

Vergleichsstruktur	RMSD (Å)	Anzahl der Cα-Atome	Sequenzidentität (%)	Lücken
Sa 2H29	1,73	169	27,22	10
Ba 2QRT	1,90	180	22,78	8
Bs 1KAQ	1,82	177	23,73	8
Ec 1K4M	2,05	181	20,44	10
Pa 1YUM	2,54	177	16,95	10
N1 1KQN	2,21	178	21,35	10
PfNaMNAT APC	0,62	201	100,00	1

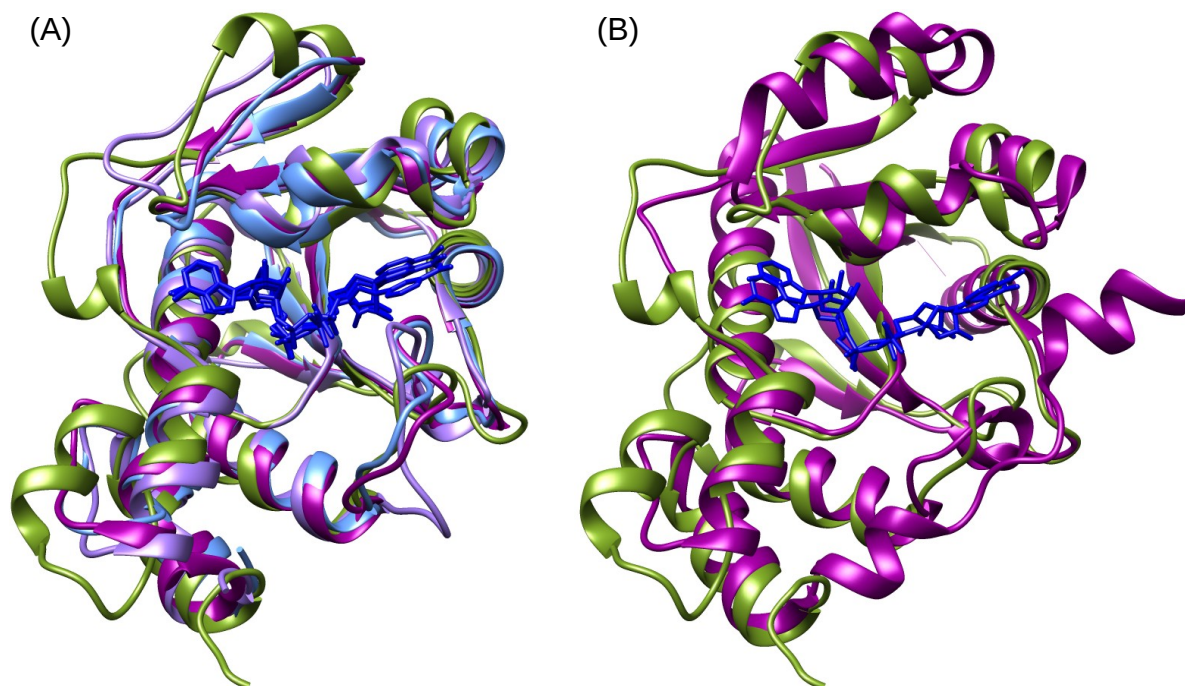


Abb. 3.23: Überlagerung bakterieller und humaner NMNAT-1 mit der PfNaMNAT.

Die Strukturüberlagerung lässt den hohen Konservierungsgrad der Rossmann-Falte innerhalb der NaMNAT-Familie erkennen. Dies gilt in hohem Maße für die bakteriellen Enzyme aus (A): SaNaMNAT (2H29, medium-lila), BaNaMNAT (2QTR, dunkelmagenta), BsNaMNAT (1KAQ, medium-blau). Aber auch die humane NMNAT-1 (1KQN, dunkelmagenta) (B) weist eine sehr ähnliche Kernstruktur auf. PfNaMNAT ist jeweils grün eingefärbt. Die Produkte sind für alle Enzyme in dunkelblau im aktiven Zentrum gebunden. Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt.

Der höchste Homologiegrad der PfNaMNAT ist mit den NaMNATs der grampositiven Bakterien *S. aureus* (SaNaMNAT), *B. anthracis* (BaNaMNAT) und *B. subtilis* (BsNaMNAT) gegeben. Dies lässt sich anhand des Alignments sowie auch durch Strukturüberlagerung und die damit korrelierten RMSD-Werten nachvollziehen. Die RMSD-Werte der PfNaMNAT mit diesen drei Enzymen weisen die niedrigsten Werte, unterhalb von 2 Å, auf. Zugleich zeigen sie die höchsten Sequenzidentitäten. Der niedrigste RMSD-Wert und überdies höchste Sequenzidentität ist mit der SaNaMNAT gegeben. Es bestätigt sich somit noch einmal, dass dieses Enzym die beste Vorlage zum Erstellen des Homologiemodells darstellt.

Die gramnegativen Bakterien *E. coli* (EcNaMNAT) und *P. aeruginosa* (PaNaMNAT) weisen zwar ebenfalls eine konservierte Rossmann-Falte auf, sie zeigen jedoch stärkere Abweichungen zur Struktur der PfNaMNAT. Insbesondere zwischen fünftem und sechstem β -Strang sind zusätzliche Aminosäuren vorhanden (siehe Abb. 3.24), welche zu zwei α -Helices beitragen, wohingegen bei der PfNaMNAT nur eine relativ kleine gänzlich anders orientierte α -Helix ($\alpha 7$) vorhanden ist (auf eine gesonderte Darstellung dieses Bereichs in einer Strukturüberlagerung wurde verzichtet). Die betreffenden Helices sind jedoch oberflächlich, so dass das aktive Zentrum hiervon nicht beeinflusst wird. Auch anhand der RMSD-Werte, die für beide Enzyme

PfNaMNAT (3)	H-KNICIYGGSFDPITYAHMVLDKISLN-WIHEIWVVIC---R---CRNDKSLTE
Sa 2H29 (1)	M-KKIVLYGGQFNPIHTAHMIVASEVFHEL-QPDEFYFLPSFMSP---LKKHDFID
Ba 2QTR (1)	M-RKIGIIGGTFDPPHYGHLLIANEVYHAL-NLEEVWFLPNQIPP---HKQGRNITS
Bs 1KAQ (3)	--KKIGIFGGTFDPPHNGHLLMANEVLYQA-GLDEIWFMPNQIPP---HKQNEDYTD
Ec 1K4M (1)	MKSLQALFGGTFDPVHYGHLKPVELLANLI-GLTRVTIIPNNVPP---HRPQPE-AN
Pa 1YUM (2)	G-KRIGLFGGTFDPVHIGHMRSVEMAEQF-ALDELRLLPNARPP---HRETPQ-VS
N1 1KQN (6)	KTEVVLLACGSFNPIITNMHLRLFELAKDYMNGTGRYTVVKGIISPVGDAYKKKGLIP
	: * * : *
PfNaMNAT (52)	FHHRHNMFTIIINNSSKIIKSKIFLKDLESHSEMVPTYDLLKTQKE-LHP-----
Sa 2H29 (53)	VQHRLTMIQMIIDELGFG---DICDDEIKRGG-QSYTYDTIKAFKE-QHK-----
Ba 2QTR (53)	VESRLQMLELATEAEEHF---SICLEELSRKG-PSYTYDTMLQLTK-KYP-----
Bs 1KAQ (53)	SFHRVEMLKLAIQSNPSF---KLELVEMEREG-PSYTFDTVSLKQ-RYP-----
Ec 1K4M (53)	SVQRKHMLELAIAADKPLF---TLDERELKRNA-PSYTAQTLKEWRQEQQP-----
Pa 1YUM (53)	AAQRLAMVERAVAGVERL---TVDPRELQRDK-PSYIDTLESVRAELAA-----
N1 1KQN (63)	AYHRVIMAELATKNSKWV---EVDTWESLQKE-WKETLKVLRHHQE-KLEASDCDHQ
	* * : : * . :
PfNaMNAT (101)	-----NYTFYFGLGSDLICDI--FSWD--
Sa 2H29 (98)	-----DSELYFVIGTDQYNQL--EKWY--
Ba 2QTR (98)	-----DVQFHFIIGGDMVEYL--PKWY--
Bs 1KAQ (98)	-----NDQLFFIIGADMIEYL--PKWY--
Ec 1K4M (99)	-----DVPLAFIIGQDSLLTF--PTWY--
Pa 1YUM (99)	-----DDQLFMLIGWDAFCGL--PTWH--
N1 1KQN (114)	QNSPTLERPGRKRKWTETQDSSQKKSLEPKTKAVPKVKLLCGADLLESFAVPNLWKS
	. : * * : .▲▲
PfNaMNAT (121)	-EGEKLVLNFAFIIERGHFKIDESI-----LKKFPPKYYLINI
Sa 2H29 (118)	-QIEYLKEMVTFVVNRDKNSQNVN-----AMIAIQI
Ba 2QTR (118)	-NIEALLDLVTFVGVARPGYKLRTPY-----PITTVEI
Bs 1KAQ (118)	-KLDELLNLIQFIGVKRPGFHVETPY-----PLLFADV
Ec 1K4M (119)	-EYETILDNAHLIVCRRPGYPLEMAQPQYQQWLEDHLTHNPEDLHLQPAGKIYLAET
Pa 1YUM (119)	-RWEALDHCHIVVLQRPDADSEPPES-LRDLLAARSVADPQALK-GPGGQITFWWQ
N1 1KQN (172)	EDITQIVANYGLICVTRAGNDAQKFI-----YESDVLWKH-----RS-NIHVVNE
	: : *
PfNaMNAT (158)	-PKLSFINFISSEARKFLTENDINDIKKYIHP-LTIDYIIKYNLYDFNLE-----
Sa 2H29 (150)	-PRV---DISSTMIRQVSEGKSI---QVLVPKSVENYIKEGGLYE-----
Ba 2QTR (150)	-PEF---AVSSSLLRERYKEKKTC---KYLLPEKVQVYIERNGLYES-----
Bs 1KAQ (150)	-PEF---EVSSTMIRERFKSKKPT---DYLIPDKVKKYVEENGLY-----
Ec 1K4M (175)	-PWF---NISATIIRERLQNGESC---EDLLPEPVLTYINQQGLYR-----
Pa 1YUM (173)	-TPL---AVSATQIRALLGAGRSV---RFLVPDAVLNLYIEAHHLYRAP-----
N1 1KQN (216)	WIAN---DISSTKIRRALRRGQSI---RYLVPDLVQEYIEKHNLYSSESEDNRAG
	: * : * : * : *
N1 1KQN (265)	VI LAPLQRNTA

Abb. 3.24: Strukturbasiertes Alignment verschiedener NaMNATs.

Der hohe Konservierungsgrad des zugrundeliegenden Strukturmotivs der Rossmann-Falte wird bereits anhand des Alignments ersichtlich. Helices und β -Stränge sind farblich hervorgehoben. Ebenso zwei Cysteine der PfNaMNAT sowie ein in der Struktur nicht sichtbarer Abschnitt der NMNAT-1. Im Alignment angegeben sind die Anfangsbuchstaben der jeweiligen Organismen (*S. aureus*, *B. anthracis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) respektive N1 für die humane NMNAT-1. Dahinter steht der jeweilige PDB-Code, welcher dem Strukturalignment zugrunde liegt. Die Nummerierung der Sequenzen entspricht derjenigen aus den PDB-Dateien. Die Angabe der Sekundärstruktur ist ebenfalls an die Vorgaben der PDB-Dateien angelehnt. Das Alignment wurde mit dem Espresso-Modus von T-Coffee erstellt. Für PfNaMNAT wurde jedoch nur die Sequenz herangezogen, um die Struktur nicht vorzeitig weiterzuleiten. * steht für identische Aminosäuren, : für sehr ähnliche und . für geringe Ähnlichkeit. Try119 wurde gesondert markiert ▲.

über 2 Å liegen, sowie der geringeren Sequenzidentitätswerte wird der höhere Abweichungsgrad der EcNaMNAT und PaNaMNAT zur PfNaMNAT ersichtlich.

Auch das humane Enzym NMNAT-1 weist eine überwiegend analoge Struktur auf. Größere Abweichungen finden sich nur zwischen β -Strang drei und vier, wobei diese Insertion in der Struktur nicht zu sehen ist, sowie einem verlängerten C-Terminus. Allen im Alignment untersuchten NaMNATs ist eine kurze Helix direkt im Anschluss an den dritten β -Strang gemeinsam, welche PfNaMNAT jedoch fehlt.

Auch wenn die Strukturen einander sehr ähnlich sind, weichen die Aminosäuresequenzen der einzelnen Enzyme jedoch sehr stark voneinander ab. Dadurch treten konservierte Bereiche innerhalb des Alignments jedoch deutlich hervor. Wichtige Strukturmodule können so klar identifiziert und miteinander verglichen werden. Besonders hervorzuheben sind hierbei das HXGH-Motiv [131], teilweise auch als H/TXGH-Motiv [132] oder H/TIGH [132] bezeichnet, die diesem Motiv vorausgehende Sequenz von Gly11 bis Pro15 der PfNaMNAT, Arg136 und im Alignment assoziierte Arginine, Gly109, Asp111, Try119 (▲ im Alignment) sowie das ISST-Motiv [132]. Eine Besonderheit, die nur bei PfNaMNAT zu verzeichnen ist, sind Cys41 und Cys43. An die Position von Cys41 tritt bei anderen NaMNATs ein Serin oder Aspartat. In diesen Sequenzbereich fällt auch eine von anderen NaMNATs bekannte konservierte PPHK-Sequenz [119], welche bei der PfNaMNAT nicht vorzufinden ist. Bei der im Weiteren vorgenommenen Untersuchung des aktiven Zentrums sollte sich zeigen, dass viele dieser Aminosäuren für die Interaktion mit den Substraten respektive dem Produkt NaAD von Relevanz sind.

3.2.3.4 Die Substratbindetasche der PfNaMNAT

Um die Interaktionen der PfNaMNAT mit beiden Substraten untersuchen zu können, wurden zwei Cokristallisationen durchgeführt. Die Struktur mit dem APT-Analogen APC verdeutlicht, wie dieses Substrat gebunden wird, zumal hier auch die Positionierung von β - und γ -Phosphat des APCs dargestellt werden kann. Die Struktur mit dem Produkt NaAD dagegen verdeutlicht die möglichen Interaktionen mit dem Produkt und zeigt auch auf, wie das Substrat NaMN gebunden werden muss. Da NaMN in dem Produkt vollständig erhalten bleibt (nur von ATP wird ein Molekülteil in Form von Phyrophosphat abgespalten), sollten sich die Interaktionen mit der PfNaMNAT nicht grundlegend zwischen dem Substrat NaMN und dem Produkt NaAD unterscheiden.

Zunächst soll erst einmal die Interaktion der PfNaMNAT mit dem im aktiven Zentrum gebundenen APC-Molekül untersucht werden. Um das komplexe Netzwerk aus H-Brücken, über welches das ATP-Analogen gebunden wird, zu enthüllen, wurde Chimeras „FindHBond“-Option verwendet. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse sind in Abbildung 3.26 wiedergegeben. Darauf

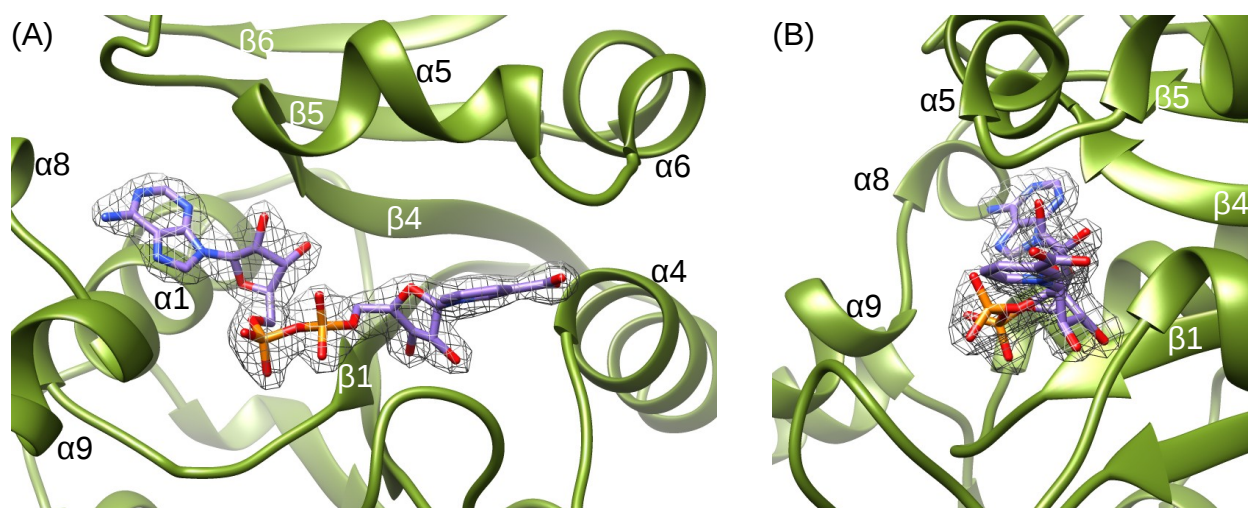


Abb. 3.25: NaAD inkl. Elektronendichte gebunden im aktiven Zentrum der PfNaMNAT.

Die $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Elektronendichte ist mit einer Ausdehnung von 1,5 Sigma dargestellt. In (A) weist die Nicotinsäure-Gruppe nach rechts. (B) ist um 90° zu dem Betrachter hin gedreht, die Nicotinsäure weist auf den Betrachter zu.

soll dann eine analoge Betrachtung der NaAD-haltigen Struktur erfolgen (siehe Abb. 3.27). Die Abbildungen geben dabei das Potential zu möglichen H-Brücken wieder, wobei auch einige nicht optimale Geometrien Berücksichtigung fanden (für die Länge wurde eine Abweichung von $0,4 \text{ \AA}$ vom Optimum zugelassen, für die Winkel eine Abweichung von 20°). Das nicht alle der gezeigten H-Brücken simultan bestehen können, erkennt man z.B. an Asp111. Hier zeigt eines der beiden Sauerstoffatome der Carboxylgruppe simultan zwei H-Brücken, wobei deren Orientierung so nicht gleichzeitig möglich ist. Zwei Atomorbitale würden sich hierbei zu nahe kommen. Wie bei den meisten chemischen Gleichgewichtslagen wird eine der beiden Situation daher eine Präferenz aufzeigen ohne das die andere jedoch völlig ausgeschlossen werden muss. Nicht zuletzt aufgrund der thermischen Wärmeschwingung des Proteins werden sich letztlich leichte Varianzen innerhalb des dargestellten Netzwerks aus H-Brücken ergeben.

Vorrangig soll hier erst einmal die Bindung des Triphosphats untersucht werden, da dies anhand der NaAD-haltigen Struktur nicht möglich ist. Hierbei fällt sofort die Bedeutung der drei Serine 167 bis 169 auf. Ihre Seitenketten, aber auch das Rückgrat trägt maßgeblich zur Ausrichtung von β - als auch γ -Phosphat bei. Außerdem besteht eine mögliche indirekte, über ein Wassermolekül vermittelte, H-Brücke zu dem α -Phosphat über die Seitenkette von Ser168. Zwei weitere Bindungen zu diesem Phosphat sind über die Stickstoffatome der Amidbindung von Phe13 sowie Ser12 möglich. His20 ist ebenfalls an der Positionierung dieses Phosphats beteiligt, aber ein weiterer Kontakt ist auch zu dem β -Phosphat möglich. Darüber hinaus ist für die Bindung dieses Phosphats Arg136 von entscheidender Bedeutung. Wobei sich diese Bindung nicht nur durch H-Brücken ergeben muss, eine Salzbrücke, ausgehend von der positiven Ladung der Guanidiniumgruppe und der negativen Ladung des Phosphats, kann hier ebenfalls die Interaktion

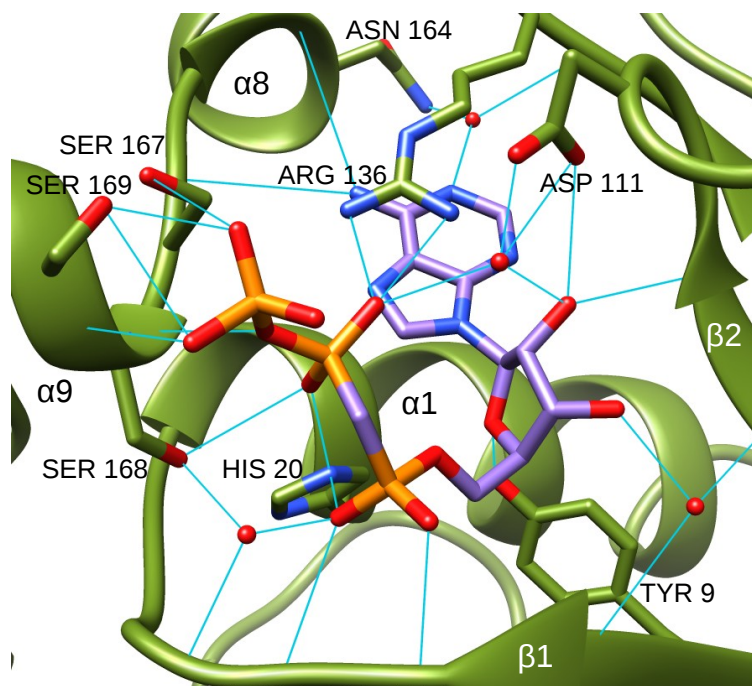


Abb. 3.26: Über H-Brücken vermittelte Bindung des APC im aktiven Zentrum.

Das ATP-Analogon APC wird über eine Vielzahl von Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des aktiven Zentrums der PfNaMNAT gebunden. Einige dieser Bindungen werden indirekt über Wassermoleküle vermittelt. In der Abbildung sind diese als rote Kugeln dargestellt. Mögliche H-Brücken zwischen Donor und Akzeptor sind als hellblaue Linien zu erkennen. Die Farbgebung der Heteroatome entspricht dem gebräuchlichen Farbcode (Stickstoff in blau, Sauerstoff in rot und Phosphor in orange). Aminosäuren sind nur benannt und gezeigt, sofern diese direkt über ihre Seitenketten mit APC interagieren. Zur Identifikation der H-Brücken wurde Chimeras „FindHBond“-Werkzeug verwendet (*relax constraints by 0,4 angstroms and 20 degrees*).

vermitteln. Asp111 ist dazu in der Lage, über eine Wasser-vermittelte H-Brücke einen Kontakt zu dem β -Phosphat auszubilden. Zuletzt verursacht der positive Dipol von Helix $\alpha 9$ noch eine Anziehung der negativen Ladung des γ -Phosphats.

Damit kann zu der Ribose übergegangen werden. Auch hier ist Asp111 an der Bindung der 2'-OH-Gruppe beteiligt. Ein weiterer Kontakt besteht zu dem Stickstoff der Amidbindung von Gly108. Die 3'-OH-Gruppe wird über eine indirekte H-Brücke gebunden, welche nur zu dem Peptidrückgrat besteht. Ebenfalls von Bedeutung für die Bindung der Ribose ist Tyr9, dessen Hydroxylgruppe eine H-Brücke zu dem Sauerstoffatom des Oxacyclopentanrings ausbildet. Es verbleibt die Adeninbase, deren Aminogruppe durch H-Brücken je eine Bindung zu dem Amidsauerstoff von Asn164 und Ile166 aufbaut. Das N1-Atom des Adenins wird über eine indirekte H-Brücke gebunden, welche zu der Seitenkette von Asn164 und dem Amidsauerstoff von Glu135 vermittelt wird. Aber auch Arg136 ist für die Ausrichtung dieses Purinrings von Bedeutung. Zwischen diesen beiden Gruppen sollte es zu einer π - π -Wechselwirkung (π *stacking effect*) ihrer jeweiligen π -Elektronensysteme kommen. Als Marginalie sei noch darauf hingewiesen, dass sich in dieser Struktur ein PEG-Molekül an der Position befindet, welche von

der Nicotinsäure eingenommen würde.

Im Vergleich mit dem Alignment aus Abb. 3.24 ergibt sich bereits, dass viele der beschriebenen Aminosäuren konserviert sind oder auch an konservierten Strukturmotiven teilhaben. Eine sehr prominente Aminosäure ist dabei Arg136, welches im Alignment bei allen Proteinen auftritt und überall eine einheitliche Funktion erfüllt [123][120]. Auch bei Asp111 handelt es sich um eine konservierte Aminosäure. Für Gly106 und Asp108 der SaNaMNAT wurden ebenfalls H-Brücken beschrieben, welche die 2'-OH-Gruppe der Ribose fixieren [120], so wie sie auch bei der PfNaMNAT zu verzeichnen sind. Auch das H/TXGH-Motiv ist für die Bindung des APC sowie des Produkts NaAD von entscheidender Bedeutung. Thr17 (bzw. Histidin bei anderen NaMNATs) sowie His20 sind an verschiedenen H-Brücken beteiligt. Je nach Rotation und Protonierungsstatus der Seitenkette von His20 sollte auch eine H-Brücke zwischen π -Stickstoff und dem ringschließenden Sauerstoffatom der Ribose möglich sein. Das Glycin dieses Motivs kann jedoch auch durch ein Alanin substituiert werden. Wichtig ist hierbei, dass es sich jeweils um eine kleine Aminosäure handelt, so dass keine sterischen Kollisionen mit ATP hervorgerufen werden. Eine Ausnahme stellt hier die humane NMNAT-1 dar. Das hier vorhandene Methionin führt jedoch dazu, dass die Adeninbase ein Stück von der α -Helix, welche das Methionin enthält, wegrückt (siehe PDB 1KQN). Von hoher Relevanz für die Bindung des Triphosphats von APC, respektive ATP *in vivo*, ist das ISST-Motiv [132]. Wobei an die Stelle des Threonins bei der PfNaMNAT ein weiteres Serin tritt, ebenso wie bei der BaNaMNAT. Aufgrund ihrer jeweiligen Geometrie sind beide Aminosäuren in diesem Fall als funktional äquivalent zu werten.

Für die Bindung des NaAD ergibt sich für den von ATP abgeleiteten Molekülteil eine sehr ähnliche Situation wie für die Bindung des APC. An die Stelle von β - und γ -Phosphat treten jedoch mehrere Wassermoleküle. Über diese ergibt sich eine indirekte Interaktion zwischen Ser168, Ser169 des ISST-Motivs und dem von ATP abgeleiteten α -Phosphat. Die Amidgruppe des Rückgrates von Phe13 ist erneut an einer direkten H-Brücke zu diesem Phosphat beteiligt. In Abb. 3.27 (B) kann man sehr gut erkennen, wie 2'- als auch 3'-OH-Gruppe der Ribose des ATP-Teils fixiert werden. Für Asp111 ergibt sich in diesem Fall ein eindeutiges Bild. Arg136 kommt nun hauptsächlich die Stabilisierung des Purinrings über die angesprochene π - π -Wechselwirkung zu. Da sich keine weiteren bedeutungsvollen Änderungen zu der Bindung des APC ergeben, soll zu dem NaMN-Teil übergegangen werden. Interessant ist, dass auch hier eine π - π -Wechselwirkung vorliegt. Diese besteht zwischen dem Pyridinring von NaAD und dem Indolring von Trp119. Außerdem wird die Carboxylgruppe der Nicotinsäure durch mehrere H-Brücken gebunden. Diese bestehen zu den Amidgruppen von Thr88 und Asp120. Ein Wassermolekül vermittelt eine weitere H-Brücke zu dem Rückgrat des Proteins. Damit enden die Interaktionen mit der Nicotinsäure jedoch noch nicht. Die negative Ladung der deprotonierten Carboxylgruppe kann durch den positiven Dipol am N-terminalen Ende von Helix α 4 ausgeglichen werden. Ein

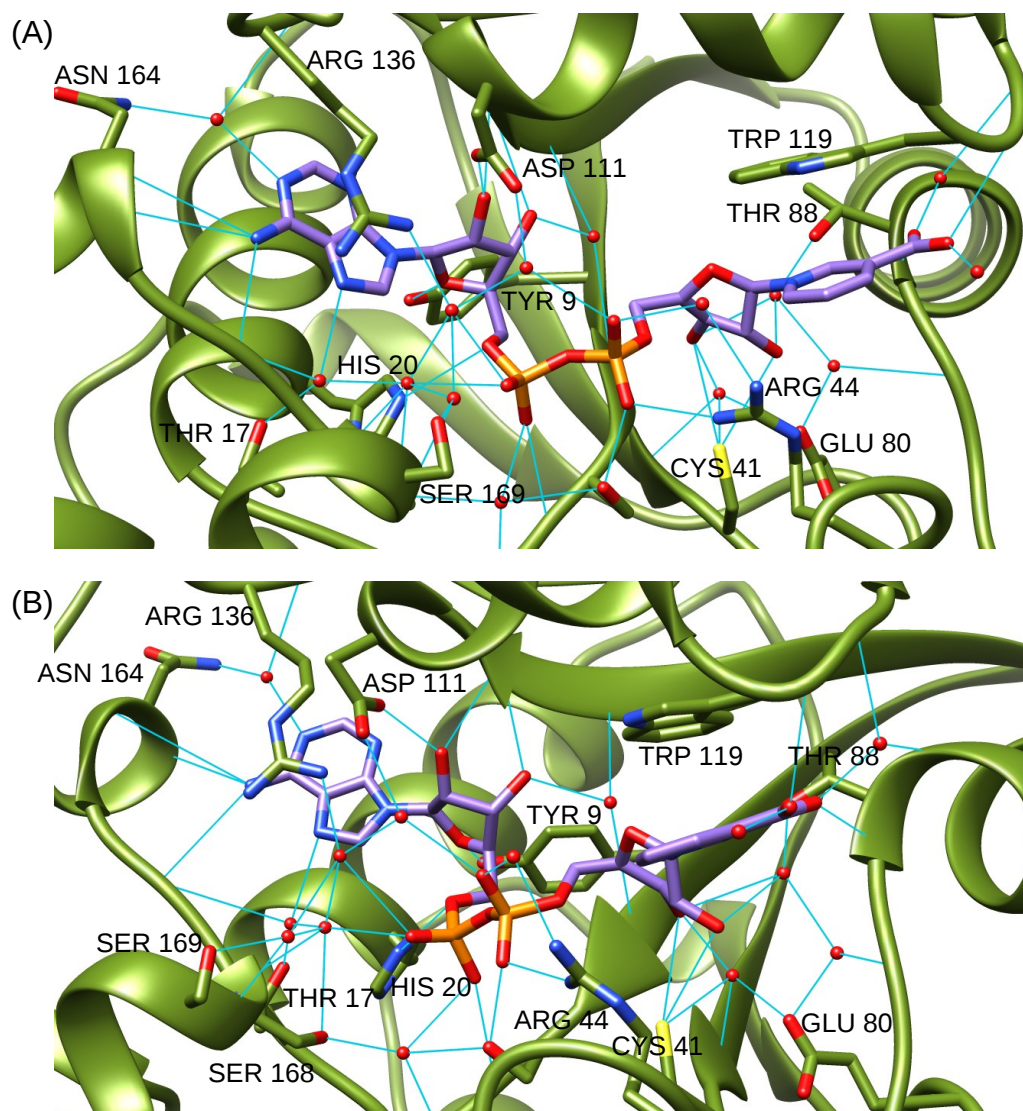


Abb. 3.27: Bindung des NaAD im aktiven Zentrum der PfNaMNAT.

Der von ATP abgeleitete Molekülteil befindet sich in (A) auf der linken Seite, der von NaMN abgeleitete rechts. In (B) wird auf die Nicotinsäure fokussiert, sie befindet sich im Vordergrund. Die Interaktionen des ATP-Teils sind analog zu den der vorherigen Abbildung. Der NaMN-Molekülteil bildet eine Vielzahl zusätzlicher Interaktionen mit dem Protein aus. Die H-Brücken wurden wie zuvor mit Chimera bestimmt.

komplexes Netzwerk von H-Brücken ist wiederum für die 2'- und 3'-OH-Gruppen der Ribose zu verzeichnen. Daran direkt beteiligt ist Cys41. Darüber hinaus ergeben sich Wasser-vermittelte Kontakte zu den Seitenketten von Glu80 und Thr88 aber auch zu dem Carbonylsauerstoff von Val39. Es verbleibt das von NaMN abgeleitete Phosphat. Dieses wird auf der einen Seite durch Arg44 gebunden, einmal unter Beteiligung eines Wassermoleküls. Auf der anderen Seite wird es direkt durch Ser12 und indirekt durch ein Wasser über Asp111 fixiert. Darüber hinaus ist natürlich auch eine elektrostatische Anziehung zwischen positiver Ladung der Guanidiniumgruppe und negativer Ladung des Phosphats möglich.

Auch für die Bindung des NaMN-Teils lassen sich bestimmte konservierte Struktur motive

verzeichnen. Die Bindung der Nicotinsäure ist identisch zu der für BaNaMNAT beschriebenen Situation [123]. Bakterielle NaMNATs weisen ebenfalls zwei an die Nicotinsäure gebundene Wassermoleküle auf. Diese wurden als konserviert beschrieben [123] und treten auch bei der PfNaMNAT auf. Ein Vergleich mit dem Alignment enthüllt, dass Trp119 einen hochgradig konservierten Rest darstellt. Bei der humanen NMNAT-1 ist es lediglich im Alignment um eine Position verschoben, übernimmt jedoch eine identische Aufgabe [135].

Ein weiteres teils konserviertes Motiv stellt die PPHK-Sequenz dar. Bei der BaNaMNAT und BsNaMNAT sind dies die Aminosäuren Pro42 bis Lys45. Für diese Aminosäuren wurde bei der BaNaMNAT eine Interaktion mit dem Nicotinring sowie dem NaMN-abgeleiteten Phosphat beschrieben [119][123]. Bei der SaNaMNAT ist Pro43 in eine hydrophobe Interaktion mit dem Pyridinring der Nicotinsäure involviert und Leu44 baut einen van-der-Waals-Kontakt zu demselben Pyridinring auf [120]. Die Struktur der SaNaMNAT (PDB: 2H29) lässt erkennen, dass die Aminogruppe von Lys45 direkt über dem von NaMN abgeleiteten Phosphat zu liegen kommt. Auch das Alignment (siehe Abb. 3.24) bestätigt, dass es sich bei dem PPHK-Motiv um eine bei Bakterien konservierte Sequenz handelt. Wobei statt des Lysins oftmals ein Argenin auftritt. Eine gänzlich andere Sequenz zeigt hier jedoch die PfNaMNAT. Innerhalb des Alignments fallen in diesem Bereich zwei Cysteine auf, welche nur durch eine Aminosäure voneinander getrennt werden. Da diese Cysteine nicht im Bereich einer Helix liegen, liegt die Vermutung nahe, dass ein Disulfid gebildet wird. Abb. 3.28 lässt jedoch klar erkennen, dass diese Cysteine sowohl in der NaAD- als auch in der APC-Struktur der PfNaMNAT kein Disulfid

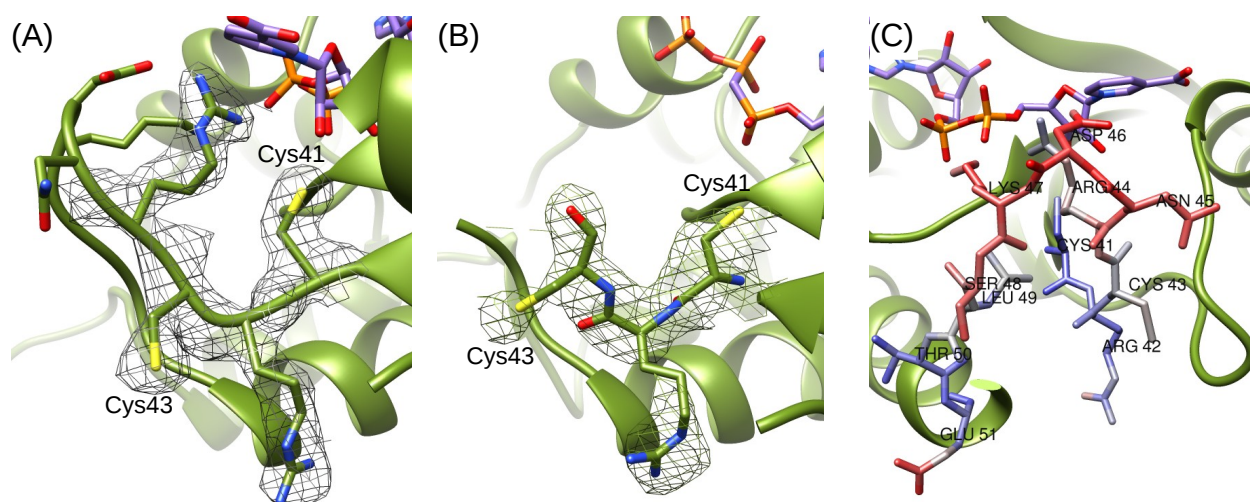


Abb. 3.28: Cysteine 41 und 43 der PfNaMNAT mit assoziiertem Loop.

(A) und (C) sind Abbildungen der NaAD-haltigen Struktur, (B) der APC-haltigen. (A) sowie (B) stellen die korrespondierende $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Elektronendichte der Cysteine 41 und 43 dar. Die Elektronendichten sind bei einer Ausdehnung von 1 Sigma gezeigt. In der APC-haltigen Struktur ist keine hinreichende Dichte gegeben um die Aminosäuren 44 bis 47 zu modellieren, wobei Cys43 bereits strittig ist. Bei (A) und (B) wurden die Aminosäuren Glu80 bis Thr88 entfernt, um auf den Loop fokussieren zu können. Die Darstellung der B-Faktoren (C) geht von einem Blauton hin zu rot für Bereiche mit hohen B-Faktoren.

bilden. In der APC-Struktur weist dieser Loop eine derart hohe Beweglichkeit auf, dass für die Aminosäuren 44 bis 47 keine Elektronendichte gegeben ist und Cys43 nicht mehr sicher positioniert werden kann. Aber auch innerhalb der NaAD-Struktur weist diese Region eine hohe Flexibilität auf, wie man an den relativ hohen B-Faktoren erkennen kann. Die Funktion, die im PPHK-Motiv vom Lysin übernommen wird, könnte bei der PfNaMNAT gemeinsam durch Lys47 und Arg44 erfüllt werden.

Wie bereits beschrieben, kann Cys41 H-Brücken zu den OH-Gruppen der Ribose ausbilden. Mit 3,5 und 3,8 Å ist diese Distanz zwar relativ hoch, jedoch sind H-Brücken unter Beteiligung von Schwefel länger als solche, die Stickstoff oder Sauerstoff involvieren. Dies liegt an der diffusen Elektronenwolke des Schwefels und seiner größeren Ausdehnung [138]. Die mittlere Länge solcher H-Brücken wurde mit $3,52 \pm 0,24$ Å angegeben [139]. Die Funktion dieses Cysteins, einen Kontakt zur Ribose herzustellen, wird bei vielen bakteriellen NaMNATs übernommen von Serin, Threonin oder Asparagin. Bei EcNaMNAT interagiert Asn40 mit der 2'-OH-Gruppe der NaMN-Ribose [132]. Glu80 erstellt einen indirekten Kontakt über ein Wassermolekül zur 3'-OH-Gruppe der Ribose. Auch hierfür existiert bei anderen NaMNATs ein funktionales Äquivalent. Bei EcNaMNAT (PDB: 1K4M) kann dies erfüllt werden durch Glu76, wobei wieder ein indirekter Kontakt zur Ribose besteht. In der *Methanobacterium thermoautotrophicum* NaMNAT (MtNaMNAT) finden sich H-Brücken zwischen der 2'-OH-Gruppe und Asp80 sowie der 3'-OH-Gruppe und Ser39 [140]. Auch bei der PaNaMNAT finden sich Entsprechungen, es sind dies Asn40 und Glu76 (PDB: 1YUM).

3.2.3.5 Vergleich der Substratbindetaschen verschiedener NaMNATs

Aus der vorausgehenden Beschreibung des aktiven Zentrums der PfNaMNAT wird bereits ersichtlich, dass viele Interaktionen mit den Substraten und folglich auch dem gebildeten Produkt zwischen den Enzymen verschiedener Organismen zu einem hohen Grad konserviert sind. Es stellt sich jedoch die Frage, wie es sich mit der übergeordneten Geometrie der Substratbindetasche verhält. Hierzu sind in Abb. 3.29 und 3.30 die Oberflächen mehrerer NaMNATs mit Aufsicht auf das aktive Zentrum dargestellt. Interessant ist hierbei gerade im Vergleich mit den bakteriellen NaMNATs, die verhältnismäßig offene Geometrie bei der humanen NMNAT-1 (*in vivo* sollte diese eine stärker geschlossene Konformation einnehmen können). Dagegen wird das Produkt (jeweils NaAD) bei SaNaMNAT, BaNaMNAT und BsNaMNAT geradezu eingeschlossen. Es verbleiben nur relativ kleine Öffnungen über der Carboxylgruppe der Nicotinsäure und den beiden zentralen Phosphaten. Dies ist auch bei der PfNaMNAT der Fall, es verbleibt jedoch eine geringfügig größere Öffnung als bei bakteriellen NaMNATs. Erklären kann man dies teilweise anhand des Alignments aus Abb. 3.18 aber auch anhand der begleitenden Cartoondarstellung. Der Verschluß des aktiven Zentrums wird nämlich

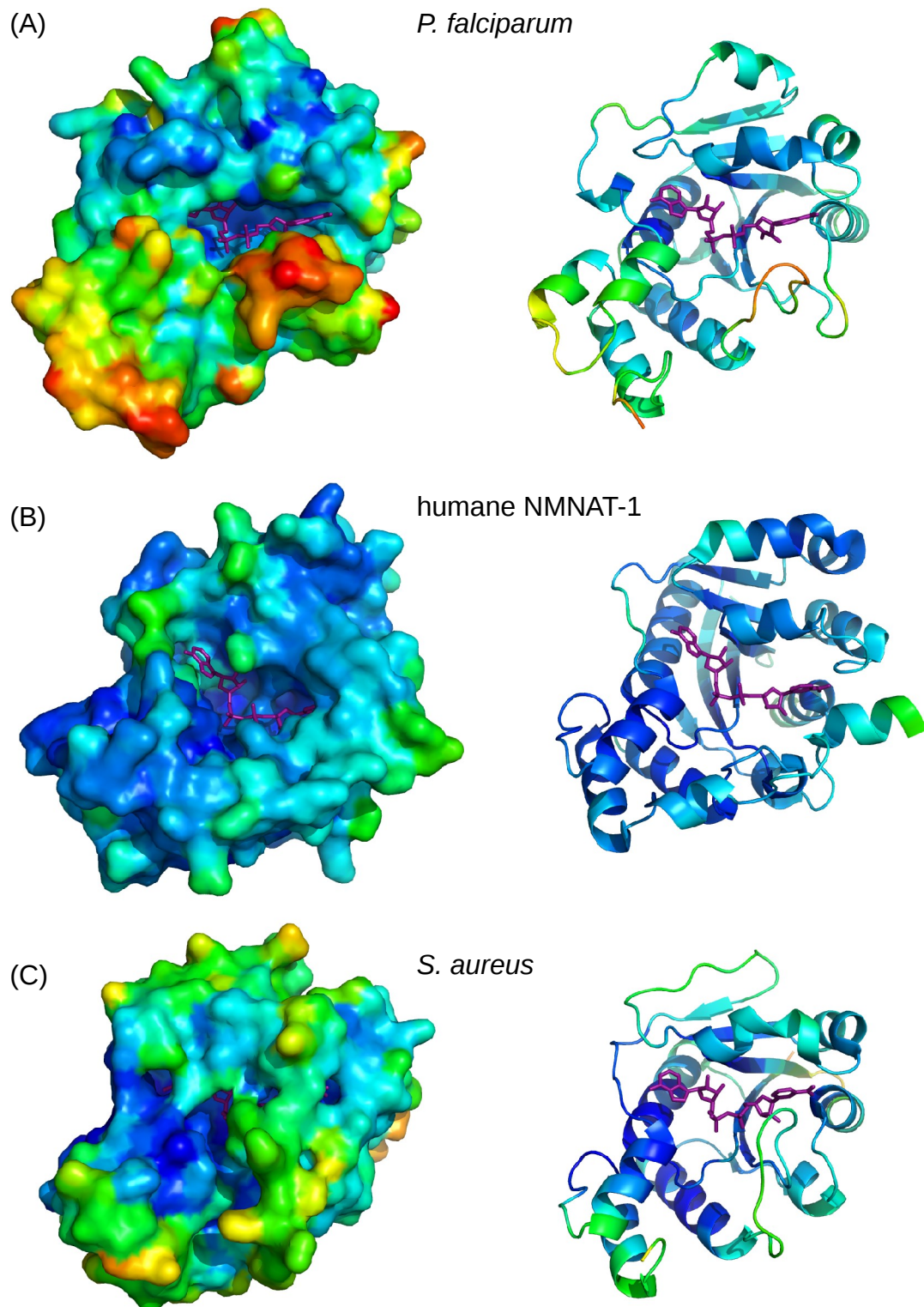


Abb. 3.29: Vergleich der Oberflächen und B-Faktoren verschiedener NaMNATs.

Alle Proteinstrukturen wurden anhand der C α -Atome mittels PyMol ausgerichtet und somit in identische Orientierungen gebracht. Sämtliche Strukturen haben ein Produkt gebunden. Zudem wurden die Oberflächen als auch Cartoondarstellungen anhand der B-Faktoren eingefärbt (angelehnt an gebräuchliche Darstellungen von Temperaturen von blau, grün, gelb, orange zu rot). (A) ist PfNaMNAT mit NaAD, (B) NMNAT-1 (1KQN) und (C) SaNaMNAT (2H29).

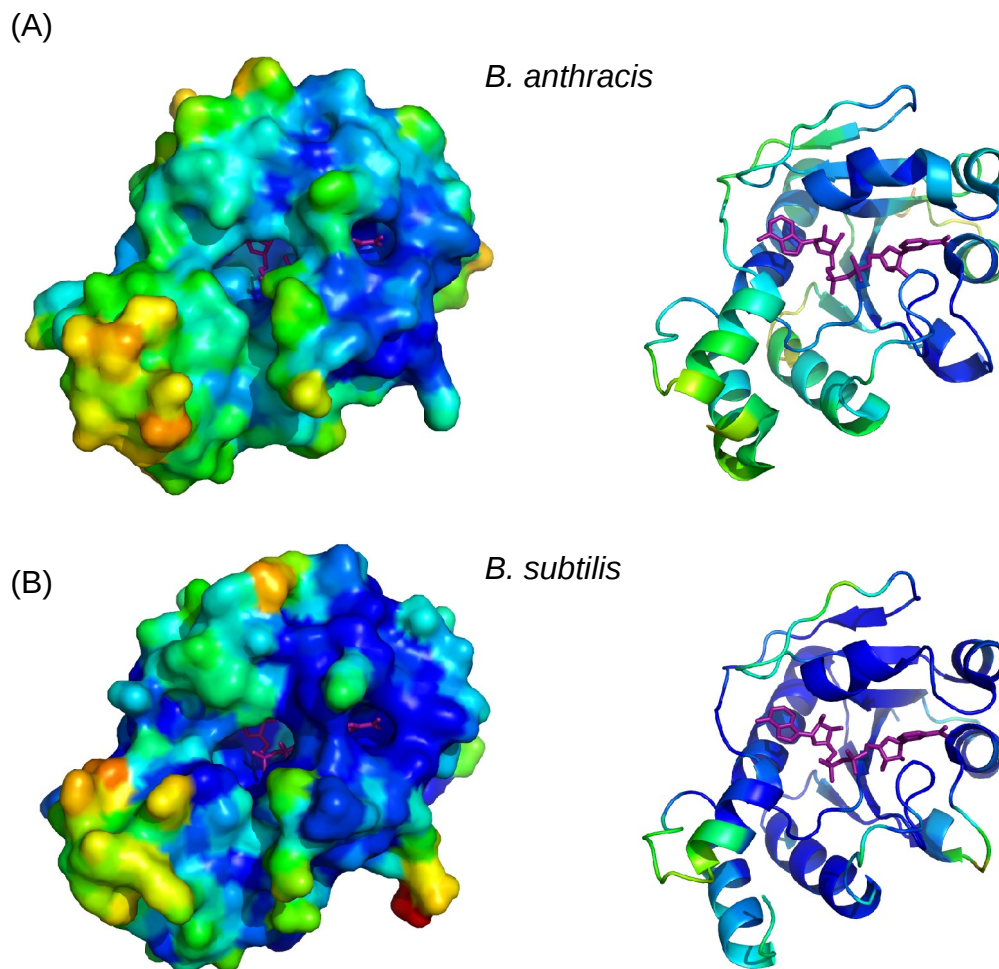


Abb. 3.30: Vergleich der Oberflächen und B-Faktoren verschiedener NaMNATs – Fortsetzung.

Die Darstellung ist der vorausgehenden Abbildung analog. Wiederum sind die Protein in der gleichen Orientierung zusehen und anhand der B-Faktoren eingefärbt. Es handelt sich um (A) BaNaMNAT (2QTR) und (B) BsNaMNAT (1KAQ).

zu einem großen Teil durch einen Loop bewirkt, welcher bei den gezeigten bakteriellen NaMNATs deutlich länger ausfällt als bei der PfNaMNAT. Dieses Loop umfasst auch das PPHK-Motiv, welches bei der PfNaMNAT so nicht auftritt. Im Alignment weist die PfNaMNAT hier weniger Aminosäuren auf. Daher fällt ihr Loop hier etwas kleiner aus. Der Verlauf des Rückgrats der NMNAT-1 weicht hier deutlich ab. Der bei ihr vorhandene Loop liegt zwischen zwei Helices und ist wesentlich kürzer. Er reicht daher nicht bis über die Ribose des NMN. Interessant ist hier auch ein Vergleich mit der PaNaMNAT, deren aktives Zentrum ähnlich weit offen liegt wie bei der NaMNAT-1. Der Verlauf ihres Rückgrates ähnelt hier sehr der Sekundärstruktur der NMNAT-1. Das Alignment enthüllt, dass auch die PaNaMNAT nur einen kurzen Loop aufweist, welcher zwischen zwei Helices liegt (vergleiche PDB: 1YUM).

Darüber hinaus sind Abb. 3.29 und 3.30 gemäß ihrer B-Faktoren eingefärbt. Hohe B-Faktoren,

also warme Bereiche, sind rot dargestellt, kalte Bereiche dagegen blau. Dies verdeutlicht auch noch einmal die hohe Flexibilität des beschriebenen Loops bei der PfNaMNAT. Hohe B-Faktoren treten darüber hinaus bei allen NaMNATs innerhalb des C-Terminus auf. Wobei die PfNaMNAT auch hier besonders hervorsteicht. Nur die NMNAT-1 weist auch hier, so wie über das gesamte Enzym, relativ geringe Temperaturfaktoren auf. Wobei die NMNAT-1 C-terminal eine zusätzliche Helix aufweist, welche stabilisierend auf die ansonsten leicht flexiblen Helices wirken dürfte.

Hier sei noch einmal angemerkt, dass hohe Temperaturfaktoren zwar auf eine vergleichsweise hohe Flexibilität der betreffenden Bereiche schließen lassen, der Umkehrschluss ist jedoch nur bedingt möglich. Kalte Bereiche, also niedrige B-Faktoren, können durchaus eine Flexibilität aufweisen. Innerhalb eines Kristalls kann hier jedoch durch intermolekulare Kristallkontakte eine Struktur deutlich fixiert werden.

3.2.3.6 Quartärstruktur der PfNaMNAT

Der Oligomerisierungsstatus von NaMNAT unterscheidet sich zwischen verschiedenen Organismen. Für die BaNaMNAT wurde beschrieben, dass es sich um ein biologisches Dimer handelt, bei dem vermutlich negative Kooperativität bei der Substratbindung gegeben ist [123]. Auch bei der SaNaMNAT handelt es sich um ein Dimer mit einer zweifachen Symmetrieachse [120]. MtNaMNAT, humane NMNAT-1 als auch *Synechocystis* NaMNAT (SyNaMNAT) wurden als Hexamer beschrieben [140][135][141]. EcNaMNAT dagegen wurde als Monomer eingeordnet [132]. PfNaMNAT selbst kristallisierte in zwei verschiedenen Raumgruppen. Einmal in P 1 mit zwei Proteinen in der asymmetrischen Einheit und einmal in P 2₁ mit nur einem Protein in der asymmetrischen Einheit (siehe Tab. 1 Seite 80). Auch sind die Kristallkontakte der beiden Kristallformen nicht identisch. Ein biologisches Dimer oder auch Oligomer sollte dagegen jedoch in jeder Kristallform vorhanden sein, da die Dimerisierung über die Kontaktflächen thermodynamisch vorteilhaft ist. Der Oligomerisierungsstatus der PfNaMNAT wurde zudem in Lösung, mittels Gelfiltration, untersucht (siehe Abb. 3.5). Die PfNaMNAT eluierte hierbei in einem einzigen Peak mit einem Elutionsvolumen von 94,9 ml. Dies entspricht, bei der genutzten Superdex 200 Säule, einer Größe von ca. 22 kDa, was ungefähr der rechnerischen Größe des Monomers gleichkommt.

3.2.4 Kinetische Charakterisierung von NaMNAT und seinen Mutanten

Neben einer strukturellen Untersuchung der PfNaMNAT erfolgte auch eine kinetische Charakterisierung des Enzyms. Dies sollte nicht nur genutzt werden, um den Wildtyp (WT) zu

charakterisieren, sondern auch, um den Einfluss von Cys41 sowie Cys43 auf die Katalyse zu evaluieren. Hierzu wurden drei Mutanten der PfNaMNAT erstellt, es sind dies PfNaMNAT^{C41A}, PfNaMNAT^{C43A} sowie PfNaMNAT^{C41A,C43A}. Zur Beobachtung der Reaktion wurde ein diskontinuierlicher Assay herangezogen, welcher auf der kolorimetrischen Detektion eines Phosphomolybdatkomplexes beruht [92]. Das im Laufe der Katalyse von ATP abgespaltene PP_i musste dazu noch durch eine Pyrophosphatase in P_i hydrolysiert werden. Es handelte sich somit um einen gekoppelten Assay.

3.2.4.1 Ammoniummolybdat/Ascorbat basierte Kinetik

Zunächst sollte ein Assay herangezogen werden, welcher auf der Reduktion eines Phosphomolybdatkomplexes durch Ascorbinsäure beruht. Dieser Assay wurde gewählt, da er eine starke Farbentwicklung, gute Linearität und hohe Sensitivität versprach und gleichzeitig durch 10 mM ATP nicht beeinflusst werden sollte [93]. Die eigentliche Reaktion des Assays wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt und über die Zugabe eines der Substrate gestartet. Im Minutentakt wurde aus dem Reaktionsansatz eine Probe entnommen und die Absorption bei 655 nm gemessen, um die Konzentration an gebildetem Phosphat zu detektieren. Über vier Minuten konnte somit jede Minute ein ΔA -Wert bestimmt werden.

Durch die Messung einer Michaelis-Menten-Kinetik für ATP, NaMN sowie NMN sollten nicht nur Michaelis-Menten-Konstante K_M und Maximalgeschwindigkeit V_{max} gemessen werden, sondern anhand der erhaltenen Werte auch die Substratpräferenz der PfNaMNAT bezüglich NaMN und NMN. Die Auswertung einiger exemplarischer Messungen ist in Abb. 3.31 wiedergegeben. Anhand der gezeigten Graphen lassen sich einige der Probleme nachvollziehen, die im Verlauf der Messungen auftraten. Zur Bestimmung eines K_M -Wertes für ATP war bei einer Konzentrationen zwischen 4 und 5 mM noch keine Sättigung erreicht (Abb. 3.31 (A) und (B)). Bei höheren ATP-Konzentrationen ergab sich jedoch das Problem, dass die zum Reaktionsnachweis genutzte Färbung wieder rückläufig war und bei 10 mM ATP vollständig ausblieb (Daten nicht gezeigt). Um zu eruieren, ob hier eine Substrathemmung gegeben wäre oder es sich um ein inhärentes Problem des Assays handelte, erfolgte eine Kontrollmessung mit verschiedenen ATP-Konzentrationen (Abb. 3.31 (E)). Diese Messung erfolgte bei einer konstanten vorgegebenen Natriumphosphatkonzentration von 0,7 mM innerhalb des Assaypuffers. Als Kontrolle wurde eine zweite identische Messung ohne ATP-Zusatz durchgeführt. Anhand der Graphik kann man leicht nachvollziehen, dass ATP-Konzentrationen über 6 mM die Färbung der Phosphatnachweisreaktion drastisch hemmen. Dies steht in klarem Widerspruch zu der Aussage der Autoren, dass dieser Assay bis 10 mM ATP nicht beeinflusst wird [93]. Da sich auch bei Messungen mit NMN (Daten nicht gezeigt) Probleme mit abnehmenden Farbintensitäten respektive Absorptionswerten ergaben, wurde für NMN ein

analoger Test durchgeführt (Abb. 3.31 (F)). Auch hier zeigte sich ein ähnliches Verhalten, jenseits von 10 mM NMN nahmen die Absorptionswerte kontinuierlich ab. Man kann annehmen, dass NMN und NaMN hierbei ein ähnliches Verhalten zeigen. Es ist davon auszugehen, dass beide Substrate, ATP und NaMN bei höheren Konzentrationen im Assay eine störende additive Wirkung zeigen. Aufgrund dieser Problematik und schlechter Reproduzierbarkeit wurde der Assay letztlich verworfen und eine Alternative herangezogen.

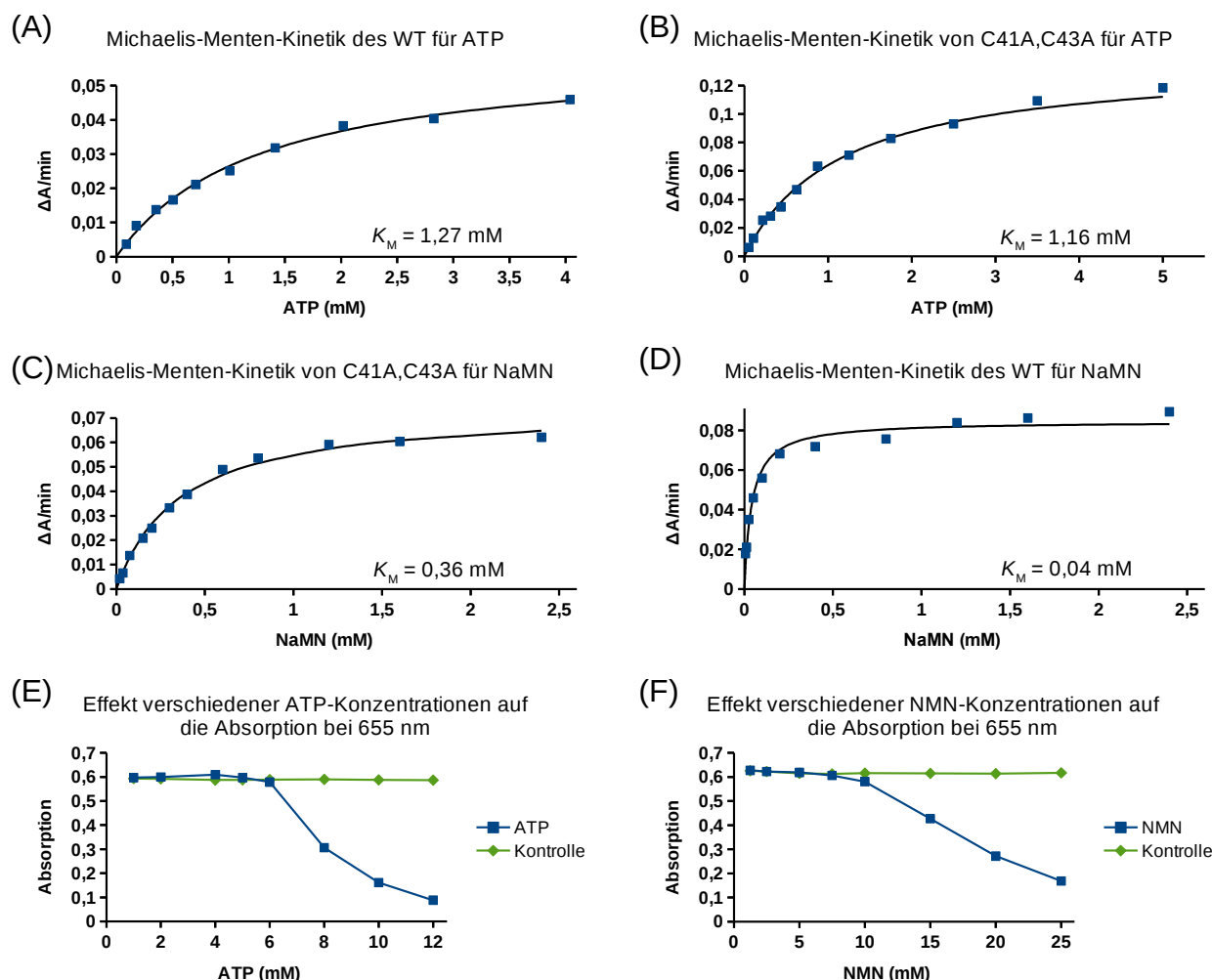


Abb. 3.31: Exemplarische Messungen zur Ammoniummolybdat basierten Kinetik.

Sowohl für den WT als auch PfNaMNAT^{C41A,C43A} wurden Michaelis-Menten-Kinetiken für verschiedene Substrate ausgewertet (A-D). Bei hohen ATP-Konzentrationen ergaben sich dabei rückläufige Absorptionswerte, d.h. eine Abnahme der Farbeintensität. Daher wurde in Kontrollmessungen, bei konstanter Natriumphosphatkonzentration von 0,7 mM, der Einfluss der Substrate ATP (E) und NMN (F) auf die Absorption untersucht (jeweils in Doppelbestimmung gemessen) und zu hohe Substratkonzentrationen in den weiteren Messungen vermieden.

3.2.4.2 Malachitgrün basierte Kinetik

Da die Detektion von P_i ein gebräuchliches Verfahren darstellt, sollte der zugrunde liegende gekoppelte Enzymassay beibehalten werden. Es erfolgte jedoch eine Umstellung des Detektionsverfahrens hin zu einem Ammoniummolybdat/Malachitgrün-Reagenz. Unter mehreren auf der Bildung eines Phosphomolybdatkomplexes beruhenden kolorimetrischen Methoden, zeigte Malachitgrün die höchste Sensitivität [92]. Darüber hinaus wurde das Malachitgrün-Reagenz bereits zuvor für eine Endpunktbestimmung der BaNaMNAT sowie EcNaMNAT herangezogen [124].

Wiederum wurde durch die PfNaMNAT bei der Katalyse zuerst PP_i freigesetzt und dieses durch Pyrophosphatase zu P_i hydrolysiert. Hiervon wurden mehrere Reaktionen parallel in einer Mikrotiterplatte (*half area*) mit verschiedenen Substratkonzentrationen angesetzt. Zu Zeitpunkten von 0, 1, 2 und 3 min wurde davon jeweils eine Probe für den Phosphatnachweis herangezogen. Auch diese kolorimetrische P_i -Detektion erfolgte in Mikrotiterplatten (siehe Abb. 3.32). Als Kontrolle diente ein identischer Ansatz mit verschiedenen Substratkonzentrationen, jedoch ohne PfNaMNAT. Hierüber konnte eine durch ATP hervorgerufene Hintergrundfärbung festgestellt werden. Die energetisch labile Bindung zwischen α - und β -Phosphat führte mutmaßlich dazu, dass bereits einige PP_i -Gruppen frei vorlagen und proportional mit der ATP-Konzentration zunahen. Die Messwerte zu 0 min und diejenigen der Kontrolle zeigten dabei nahezu identische Absorptionswerte. Da im Laufe der Reaktion zusätzliches P_i freigesetzt wurde, ist mit der Zeit eine kontinuierliche Zunahme der Färbung zu verzeichnen.

Für die Auswertung der Messungen wurden jeweils die Differenzwerte der Absorptionen berechnet. Als positiver Nebeneffekt wurden die Messungen dadurch um die Hintergrundfärbung bereinigt. Die Quantifizierung der gebildeten Phosphatmenge erfolgte über eine NaP_i -

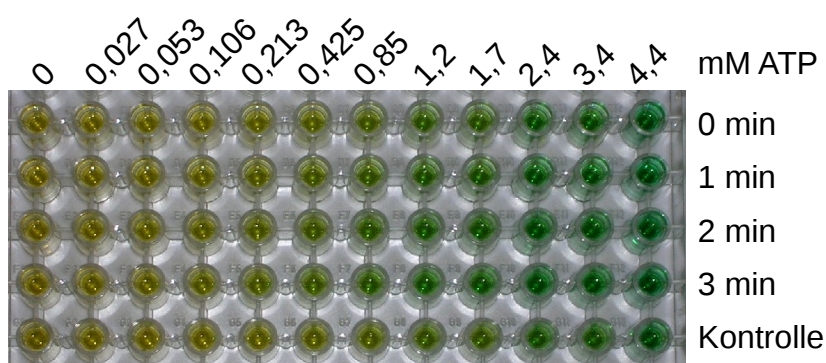


Abb. 3.32: Exemplarischer Mikrotiterplatten-Assay für die Bestimmung eines ATP- K_M -Wertes.

Über einen Zeitraum von 3 min wurde jeweils minütlich eine Messreihe zur P_i -Detektion erstellt. Für die Berechnung einer Michaelis-Menten-Kinetik wurden hierzu aufsteigende Substratkonzentrationen, in diesem Fall ATP, vermessen. Durch die Hintergrundfärbung weisen Kontrolle und 0 min Messwert nahezu identische Färbungen auf. Bei gegebener Konzentration nimmt die Färbung jedoch über die Zeit zu.

Standardkurve (Abb. 3.33). Für alle drei Substrate wurde eine gesonderte Standardgerade erstellt, d.h. für die Messung einer NaMN- oder NMN-Kinetik wurde die ATP-Kurve als Standard genutzt, da ATP hier jeweils in einer fixen Konzentration im Assay vorlag. Für die ATP-Kinetiken war der umgekehrte Fall gegeben, es kam die NaMN/NMN-Kurve für die Auswertung zur Anwendung. Die Messung einer Standardkurve mit NaMN oder NMN ergab identische Kurven, daher wurden ihre jeweiligen Messwerte gemeinsam ausgewertet. Anhand der Standardgeraden erkennt man auch, dass ATP eine wesentlich stärkere Hintergrundfärbung hervorruft, als eines der beiden anderen Substrate, die initialen Absorptionswerte sind höher.

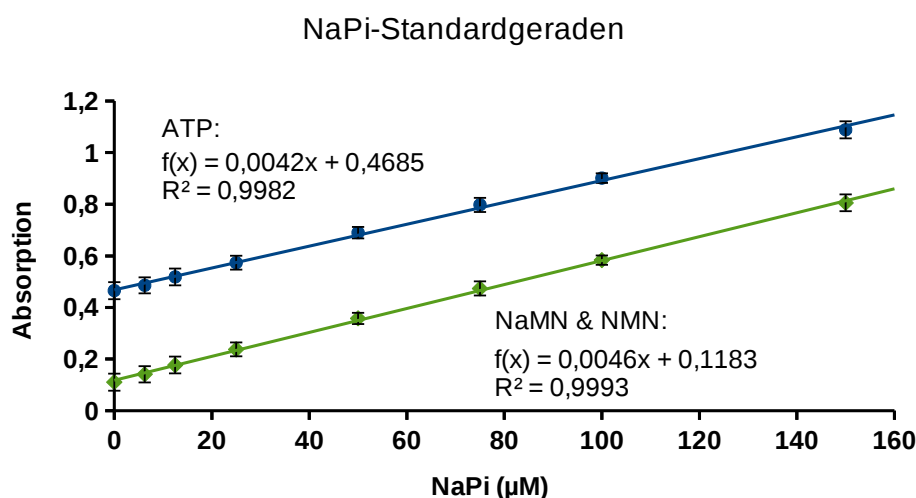


Abb. 3.33: NaP_i-Standardgeraden zu dem Malachitgrün-Assay.

Um die gemessenen Absorptionswerte mit der gebildeten P_i-Menge korrelieren, zu können wurden zwei NaP_i-Standardgeraden erstellt. Da für die Michaelis-Menten-Kinetik jeweils eine konstante Menge eines Substrates vorgelegt war, wurde für alle drei Substrate ein Standard mit festgelegter Konzentration eines der Substrate im Hintergrund gemessen (1 mM NaMN oder NMN, 3,5 mM ATP). Für jedes der drei Substrate wurden acht Reproduktionen gemessen.

Über die gemessenen Absorptionswerte ($\Delta A/\text{min}$) konnte so auf die gebildete P_i-Menge geschlossen werden und über die eingesetzte Volumenaktivität der PfNaMNAT die Reaktionsgeschwindigkeit ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) bestimmt werden. Die so ermittelten kinetischen Parameter der PfNaMNAT und ihrer Mutanten sind in Tab. 6 aufgelistet. Darüber hinaus sind einige exemplarische Graphen zu den Kinetiken in Abb. 3.34 dargestellt. Die Auswertung erfolgte für jeden Graphen jeweils gesondert und die erhaltenen Werte für K_M und V_{\max} wurden für eine statistische Auswertung miteinander verrechnet. In der Auswertung fanden meistens nur die Messwerte zwischen 0 und 1 min Berücksichtigung, da nachfolgende Messungen bereits meist einen Abfall der Geschwindigkeit aufwiesen. Jedem Wert liegen mindestens drei unabhängige Messungen zugrunde, meistens jedoch mehr und teilweise bis zu elf Einzelmessungen. Die Datenauswertung erfolgte mit LibreOffice durch eine nicht lineare

Regression (SCO Evolutionary Algorithm) und wurde stichprobenartig mit GraphpadPrism kontrolliert. Beide Programme ermittelten exakt gleiche Werte.

Tab. 6: K_M - und V_{max} -Werte der PfNaMNAT und ihrer Mutanten.

		K_M (μM)	V_{max} ($\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \cdot \text{min}}$)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M
Wildtyp	ATP	525 ± 99	$0,191 \pm 0,063$	$4,9 \pm 1,6$	0,009
	NaMN	22 ± 11	$0,154 \pm 0,024$	$3,9 \pm 0,6$	0,177
	NMN	40 ± 14	$0,204 \pm 0,076$	$5,2 \pm 1,9$	0,13
PfNaMNAT ^{C41A}	ATP	1186 ± 299	$0,111 \pm 0,023$	$2,2 \pm 0,9$	0,002
	NaMN	323 ± 120	$0,264 \pm 0,123$	$6,7 \pm 3,1$	0,021
	NMN	753 ± 42	$0,179 \pm 0,096$	$4,5 \pm 2,4$	0,006
PfNaMNAT ^{C43A}	ATP	624 ± 222	$1,651 \pm 0,428$	42 ± 11	0,07
	NaMN	11 ± 3	$2,431 \pm 0,361$	62 ± 9	5,63
	NMN	25 ± 6	$3,075 \pm 0,920$	78 ± 23	3,12
PfNamnat ^{C41A,C43A}	ATP	456 ± 109	$4,531 \pm 1,091$	115 ± 28	0,25
	NaMN	194 ± 41	$5,882 \pm 1,076$	149 ± 27	0,77
	NMN	346 ± 104	$6,940 \pm 1,563$	176 ± 40	0,51

Betrachtet man die V_{max} -Werte, so fällt auf, dass der Wildtyp und PfNaMNAT^{C41A} vergleichbare kinetische Eigenschaften aufweisen. Eine um eine Größenordnung höhere Maximalgeschwindigkeit erreicht dagegen PfNaMNAT^{C43A} und PfNaMNAT^{C41A,C43A} kann diese Geschwindigkeit sogar noch einmal mehr als verdoppeln. Die Aktivitäten der einzelnen Mutanten und des Wildtyps sollen auch noch einmal gesondert in dem folgenden Abschnitt miteinander verglichen werden. Es fällt auf, dass ATP tendenziell niedrigere V_{max} -Werte aufweist als NaMN oder NMN. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von ATP die Struktur in einer für die Katalyse vorteilhafte Konformation stabilisiert und den Umsatz von NaMN sowie NMN erleichtert. So wurde ein Kristall auch erst durch Zusatz des ATP-Analogons APC erhalten.

Nicht weniger interessant ist eine genaue Betrachtung der K_M -Werte. Für ATP zeigen Wildtyp, PfNaMNAT^{C43A} und PfNaMNAT^{C41A,C43A} ähnliche Werte um ca. 500 μM . Nur PfNaMNAT^{C41A} bricht hier aus dem Schema aus. Hier wurde ein K_M von ca. 1,2 mM gemessen. Allerdings muss man hier berücksichtigen, dass diese Mutante, bedingt durch Lieferschwierigkeiten eines Substrates sowie einer schlechten Proteincharge, nur in drei Reproduktionen gemessen wurde. Daher ist es durchaus möglich, dass der höhere K_M -Wert für ATP keine inhärente Eigenschaft dieser Mutante darstellt. Für diese Vermutung spricht auch, dass der K_M von PfNaMNAT^{C41A,C43A}

dem des Wildtyps entspricht. Zu den K_M -Werten für NaMN als auch NMN lässt sich festhalten, dass der Wildtyp und PfNaMNAT^{C43A} ähnlich niedrige Messwerte aufweisen, die Mutante sogar etwas niedrigere. Um mehr als eine Größenordnung höher fallen dagegen die K_M -Werte von PfNaMNAT^{C41A} als auch PfNaMNAT^{C41A,C43A} aus. Eine weitergehende Analyse dieses Sachverhaltes soll noch in der Diskussion erfolgen. Letztlich lässt sich hier festhalten, dass Cys41 als auch Cys43 wenn überhaupt nur geringste Auswirkung auf die kinetischen Kenngrößen von ATP aufweisen. Ganz anders verhält es sich hingegen mit NaMN, als auch NMN. Der K_M dieser beiden Substrate wird in gleichem Maße durch Cys41 beeinflusst, so dass man sagen kann, dass Cys41 katalytisch relevant sein muss. Dagegen erscheint es für die PfNaMNAT sogar von Vorteil zu sein, wenn Cys43 entfernt wird, der K_M sinkt leicht und die Geschwindigkeit steigt merklich an.

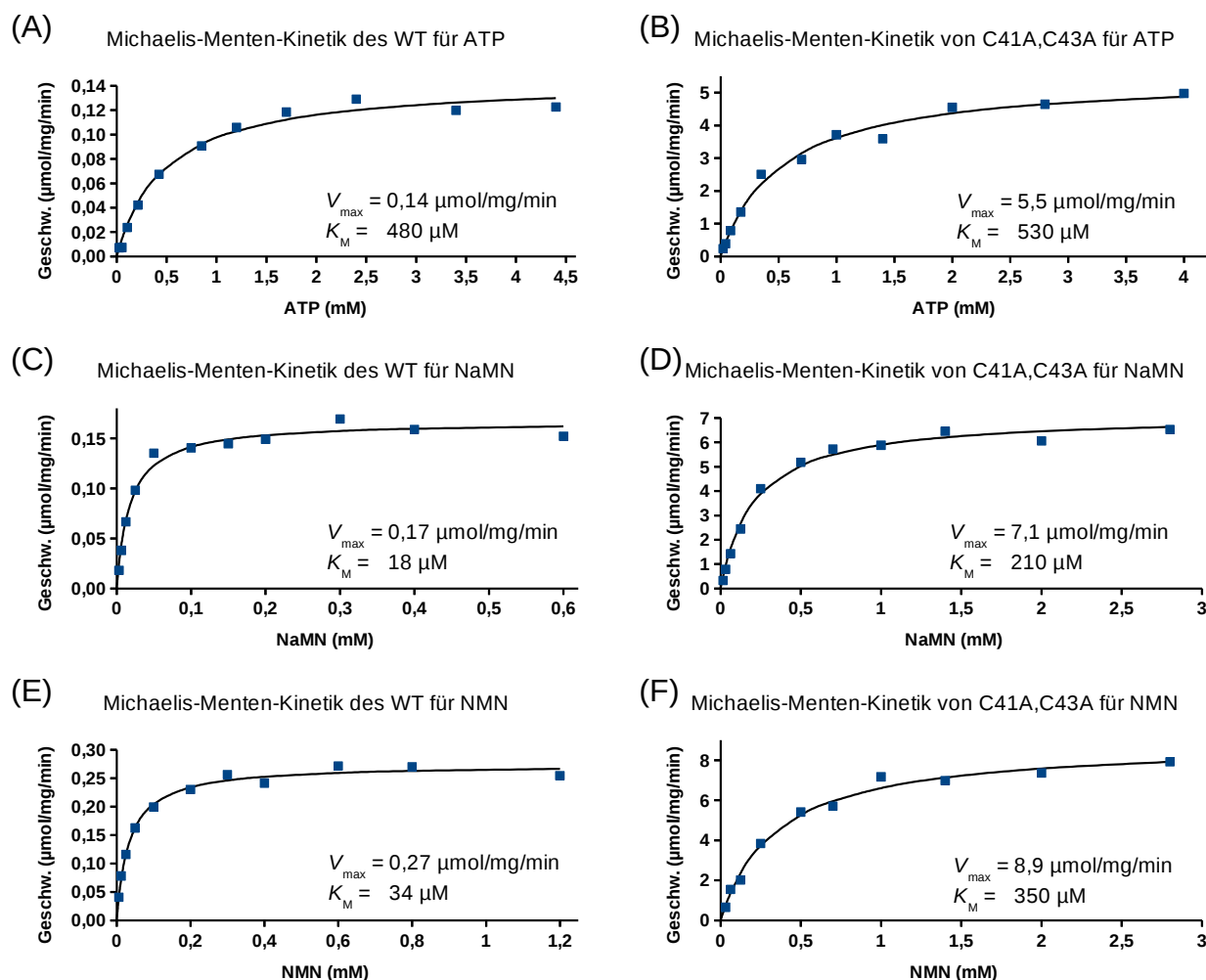


Abb. 3.34: Repräsentative Einzelmessungen zur Michaelis-Menten-Kinetik der PfNaMNAT.

Der Wildtyp (WT) und PfNaMNAT^{C41A,C43A} der PfNaMNAT sind sich hier direkt gegenübergestellt. Höchst evident ist dabei die viel höhere Aktivität von PfNaMNAT^{C41A,C43A}, ersichtlich anhand der höheren V_{\max} -Werte. Der K_M für ATP kann als identisch angesehen werden, wohingegen er bei der Mutante für die beiden anderen Substrate NaMN und NMN deutlich angestiegen ist. Die Einheit der Geschwindigkeit $\mu\text{mol/mg/min}$ kann direkt umgeformt werden zu U/mg .

Interessant ist auch ein Vergleich mit den Messungen des Ammoniummolybdat/Ascorbat-Assays. Vergleicht man hier die K_M -Werte aus Abb. 3.31 mit denen aus Abb. 3.34 oder auch den in Tab. 6 aufgelisteten, so zeigt sich, dass der Malachitgrün-Assay um einen Faktor zwei niedrigere Werte ergab. Ebenso konnte innerhalb der genutzten Konzentrationsbereiche kein negativer Effekt durch ATP auf die Färbeintensität festgestellt werden. Somit war dieser Assay die bessere Wahl.

3.2.4.3 Aktivitätsvergleich der PfNaMNAT-Mutanten mit dem WT

Bereits anhand der bestimmten K_M -Werte ist ein Vergleich der Aktivitäten der einzelnen Enzym-Varianten der PfNaMNAT möglich. Davon abgesehen wurde auch noch ein direkter Vergleich der Varianten vorgenommen. Hierzu erfolgte eine Inkubation verschiedener PfNaMNAT-Konzentrationen über einen Zeitraum von 10 min. Dabei waren jeweils konstante Konzentrationen von NaMN (1 mM) als auch ATP (5 mM) vorgegeben. Bei genügend hohen Enzymkonzentrationen wurde eine Sättigung erzielt, es kam zu einer maximalen Produktbildung, die Substrate wurden aufgebraucht. Über die somit erhaltenen Messwerte ist ein direkter Vergleich der verschiedenen PfNaMNAT-Varianten gegeben (siehe Abb. 3.35). Man erkennt, dass der Wildtyp als auch PfNaMNAT^{C41A}, im Rahmen der Messtoleranzen, bei einer gegebenen Enzymkonzentration identische Produktmengen bilden. Ein Vergleich mit den K_M -Werten aus Tab. 6 liefert hierzu konsistente Ergebnisse. Beide Proteine erreichen vergleichbare Geschwindigkeiten. Deutlich anders stellen sich hiergegen PfNaMNAT^{C43A} sowie PfNaMNAT^{C41A,C43A} dar. In beiden Fällen wird jeweils deutlich mehr Produkt auch bei geringen Enzymkonzentrationen gebildet und erreicht für PfNaMNAT^{C41A,C43A} eine maximale Geschwindigkeit. Dies wird ebenfalls durch die V_{max} -Bestimmung bestätigt. PfNaMNAT^{C43A} weist deutlich höhere Werte als der Wildtyp oder PfNaMNAT^{C41A} auf. Die höchsten Werte sind für

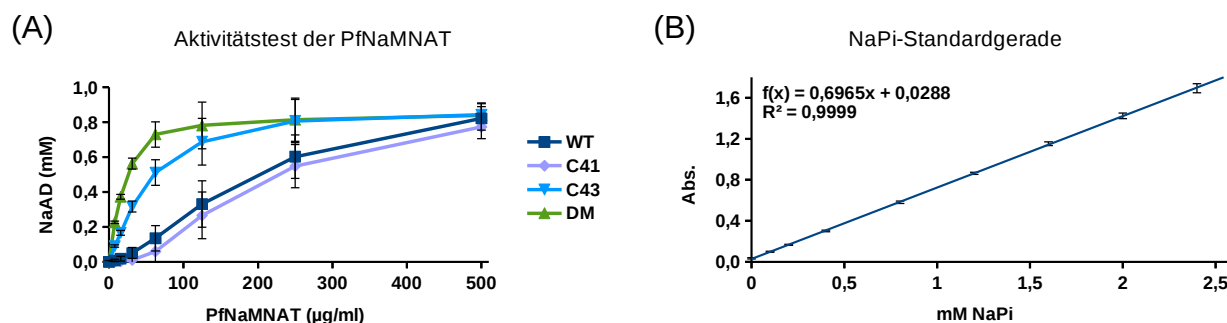


Abb. 3.35: Aktivitätsvergleich der PfNaMNAT und ihrer Mutanten.

Die durch verschiedene NaMNAT-Konzentrationen gebildete Produktmenge (NaAD) wurde über einen Zeitraum von 10 min bestimmt (A). Dabei wurden der Wildtyp und die drei Cystein-Mutanten direkt miteinander verglichen. Jede Kurve basiert auf sechs bis neun Messungen. Die Quantifizierung der Produktmenge erfolgte über NaPi mittels des Ammoniummolybdat/Ascorbat-Assays. Hierfür wurde eine weitere Standardkurve erstellt (B), welche zwar bis zu einer Absorption von 2,5 linear ist, für die eigentliche Messung wurden jedoch nur Werte bis ca. 1,3 herangezogen.

PfNaMNAT^{C41A,C43A} gegeben, sie sind mehr als verdoppelt. Unter den gegebenen Assaybedingungen ergibt sich daher keine klare Abfolge, gleiche Aktivitäten respektive Katalysegeschwindigkeiten sind für den Wildtyp und PfNaMNAT^{C41A} gegeben. PfNaMNAT^{C43A} ist wesentlich schneller und PfNaMNAT^{C41A,C43A} am schnellsten.

3.2.4.4 Auswirkung von Oxidation auf die PfNaMNAT

Bereits bei den ersten Enzymassays mit der PfNaMNAT fiel auf, dass das Protein sehr schnell an Aktivität einbüßte und innerhalb von zwei Tagen nicht mehr verwertbar war. Es zeigte sich jedoch, dass eine Reaktivierung des Enzyms durch ein Reduktionsmittel, in diesem Fall TCEP, möglich war. Daraus konnte bereits geschlossen werden, dass die PfNaMNAT oxidationssensitiv ist. Daher wurde eine gezieltere Untersuchung dieses Umstandes vorgenommen, um den direkten Einfluss der beiden Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid (H₂O₂) sowie Diamid zu testen.

Es wurde der zweiphasige Assay bestehend aus eigentlicher Produktbildung durch die PfNaMNAT und nachfolgender P_i-Detektion genutzt. Hierfür wurde erneut das Ammoniummolybdat/Ascorbat-System herangezogen. Das Protein wurde für 15 min mit dem jeweiligen Oxidationsmittel inkubiert und danach in den Assay eingesetzt. Die verbleibende Menge des so oxidierten Proteins wurde durch Zusatz von TCEP reaktiviert (Inkubation für 10 min) und das Oxidationsmittel durch einen Überschuss TCEP eliminiert. Auch dieses so behandelte Protein wurde schließlich in einen Assay überführt. Da die Stocklösungen der Proteine zur Lagerung immer 1 mM TCEP enthielten, mussten relativ hohe Konzentrationen der Oxidationsmittel aufgewendet werden. Sowohl für H₂O₂ als auch Diamid waren dies 0,5 mM, wobei die Proteine, und somit auch das TCEP, im Assay mindestens um einen Faktor von 10 verdünnt wurden. Die Reaktivierung erfolgte mit 5 mM TCEP. Um einen Einfluss dieser

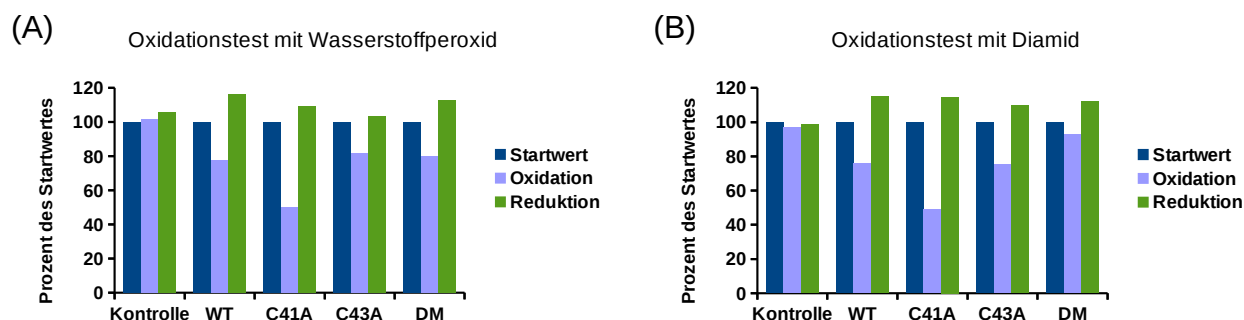


Abb. 3.36: Effekt von Oxidation auf die PfNaMNAT und ihre Cysteinmutanten.

Die Auswirkungen von Oxidation auf die PfNaMNAT und ihre Mutanten wurden systematisch durch die Zugabe von H₂O₂ und Diamid, als Thiol-spezifisches Reagenz, untersucht. Miteinander verglichen sind jeweils das unbehandelte Protein, das oxidierte und schließlich das durch Reduktion mittels TCEP reaktivierte Protein. Dieser Test wurde für jede Variante der PfNaMNAT durchgeführt (DM = PfNaMNAT^{C41A,C43A}). Jede Messung erfolgte in einer Doppelbestimmung. Der Startwert des unbehandelten Proteins wurde jeweils auf 100 % normalisiert.

Chemikalien auf den P_i-Nachweis ausschließen zu können, wurde eine Kontrolle ohne Protein aber mit konstanter P_i-Konzentration gemessen. Es konnte keine Beeinträchtigung der Farbentwicklung verzeichnet werden.

Sowohl H₂O₂ als auch Diamid zeigen einen deutlichen Effekt auf die Aktivität der PfNaMNAT. Einzig PfNaMNAT^{C41A,C43A} wird durch Diamid nicht beeinflusst. Eine Reaktivierung durch TCEP ist in jedem Fall möglich. Eine irreversible Schädigung der Proteine durch eines der Oxidationsmittel, bei den hier verwendeten Konzentrationen und Inkubationszeiten, kann somit ausgeschlossen werden. Die erneute Reduktion mit TCEP nach dem Zusatz eines Oxidationsmittels scheint die Aktivität der Enzyme dagegen sogar zu steigern. Am stärksten wird in beiden Fällen PfNaMNAT^{C41A} durch Oxidation beeinflusst. Die Aktivität halbiert sich in beiden Tests. Dies bedeutet, dass Cys43 hier einen starken Effekt verursacht. Es ist überraschend, dass der WT hier keinen ähnlich deutlichen Effekt aufweist. Entfernt man dagegen Cys43 für sich alleine ist der Oxidationseffekt nicht stärker als bei dem WT. PfNaMNAT^{C41A,C43A} bleibt durch Diamid dagegen gänzlich unbeeinflusst. H₂O₂ hat auf die DM, als auch PfNaMNAT^{C43A} und den Wildtyp ähnliche Auswirkungen. Es kann sein, dass H₂O₂ bei PfNaMNAT^{C41A,C43A} einen Thiol-unspezifischen Effekt hervorgerufen hat. So konnten z.B. für RNase A durch Oxidation, mittels H₂O₂, hervorgerufene Konformationsänderungen nachgewiesen werden, denn auch Tyrosin und Aspartat können durch H₂O₂ oxidiert werden [142]. Diamid dagegen ist wesentlich spezifischer für Sulfhydrylgruppen.

Es ist denkbar, dass der WT partiell vor Oxidation geschützt wurde, indem sich ein Disulfid zwischen Cys41 und Cys43 gebildet hat. PfNaMNAT^{C41A}, und somit das noch vorhandenen Cys43, ist deutlich anfälliger gegenüber Oxidation als der WT. Hier könnten intermolekulare Disulfide entstehen, während bei dem WT ein intramolekulares gebildet wird.

3.2.5 Suche nach einem Inhibitor der PfNaMNAT

Das Fernziel dieser Arbeit bestand in der Suche nach einem potentiellen Inhibitor der PfNaMNAT. Hierzu wurden verschiedene Tests in einer Zellkultur sowie im Enzymassay durchgeführt.

3.2.5.1 Wirksamkeitstest von Tiazofurin gegen *P. falciparum* 3D7 in Zellkultur

Die Prodrug Tiazofurin (2-β-D-Ribofuranosylthiazol-4-carboxamid) wird durch die humane NMNAT-1 in das aktive Antikrebsmittel Tiazofurinadenindinukleotid (TAD) überführt [135]. TAD ist ein potenter Inhibitor der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), die einen essentiellen Schritt der *de novo* Biosynthese aller Guanotin-Nukleotide katalysiert. Resistenzen

gegenüber Tiazofurin and verwandten IMPDH-Inhibitoren sind meist verbunden mit einem Rückgang der NMNAT-Aktivität [143]. Tiazofurin selbst liegt als Nukleosid vor, es muss daher erst noch in ein Mononukleotid überführt werden. Dieser Schritt erfolgt durch die Nukleotidkinase, die das Tiazofurinmononukleotid (TMN) herstellt. TMN wird dann schließlich durch NMNAT-1 in TAD umgewandelt [135].

Um zu eruieren, ob Tiazofurin auch als potentiell Antimalariamittel fungieren könnte, wurde ein Wirksamkeitstest direkt an *P. falciparum* vorgenommen. Dieser Test erfolgt in einer Zellkultur an den Blutstadien von *P. falciparum* (synchronisierte 3D7-Zellen bei einer Parasitämie von 0,25 % und einem Hämatokritwert von 2,5 %, eine ausführliche Beschreibung findet sich in [144]). Hierzu erfolgte erst eine Wachstumsphase unter Hypoxanthinentzug, welches später als Marker für die Überlebensrate der Parasiten genutzt werden sollte. 100 µl der Parasiten (Ringstadien) wurden schließlich mit 100 µl des Wirkstoffs für 44 h inkubiert. Dabei kamen Endkonzentration von Tiazofurin zwischen 0,61 und 38 µM zum Einsatz. Hierauf wurde den überlebenden Parasiten für 24 h erlaubt, radioaktiv markiertes Hypoxanthin aufzunehmen. Verbliebenes Hypoxanthin wurde durch einen Waschschrift entfernt und die lysierten Zellen auf einem Filter fixiert. Es erfolgte eine Auswertung mit einem Szintillationszähler. Eine Positivkontrolle wurde nicht mit dem Wirkstoff behandelt, die Negativkontrolle enthielt keine Parasiten (0% Parasitämie). Nur bei der höchsten Wirkstoffkonzentration von 38 µM zeigte sich ein moderater Effekt, mit einer um ca. 40 % verminderten Wachstumsrate. Für einen effektiven Wirkstoff ist dies nicht einmal im Ansatz hinreichend, daher erfolgten keine weiteren Tests.

3.2.5.2 Screening der MMV Malaria Box

Seit 2008 wurden annähernd sechs Millionen Verbindungen gegen die Blutstadien von *P. falciparum* getestet. Davon wiesen ungefähr 0,5 % eine Wirksamkeit mit einem EC₅₀ von unter einem Micromolar auf. Um diese Sammlung besser zugänglich zu machen, wurde eine Auswahl von 400 Substanzen in der „Open Access Malaria Box“ zusammengestellt. Die treibende Kraft hinter diesem Vorhaben ist das *Medicines for Malaria Venture* (MMV), deren Ziel die Förderung der Medikamentenentwicklung gegen Malaria ist [145]. Das primäre Auswahlkriterium der Verbindungen war dabei deren kommerzielle Verfügbarkeit. Die Malaria-Box selbst ist kostenfrei erhältlich [41].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Malaria Box in einem *in vitro* Versuch gegen PfNaMNAT getestet. Zum Nachweis diente die P_i-Detektion über das Ammoniummolybdat/Malachitgrün-Reagenz. Dabei wurde die PfNaMNAT jeweils für 10 min mit einem der Inhibitoren vorinkubiert. Diese Vorinkubation erfolgte in Gegenwart von 20 % DMSO mit einer Inhibitorkonzentration von 200 µM. Die PfNaMNAT wurde mit einer Konzentration von 100

μM eingesetzt. An diese Vorinkubation schloss sich die normale Reaktion der PfNaMNAT an, welche für 3 min erfolgen konnte. Abschließend wurde der Substratumsatz mittels des Malachitgrün-Reagenz quantifiziert. Durch einen Vergleich mit einer Kontrolle ohne Wirkstoff konnten diejenigen Bedingungen identifiziert werden, welche die Aktivität der PfNaMNAT merklich verringert hatten. Die Messungen erfolgten in Doppelbestimmungen jeder Substanz. Die hierbei identifizierten Substanzen, die am ehesten eine Wirksamkeit aufwiesen, wurden separat für eine IC_{50} -Bestimmung herangezogen. Für zwei der Substanzen konnte dabei eine moderate Wirksamkeit belegt werden, es sind dies MMV666599 (IC_{50} : 1,15 mM) sowie MMV000478 (IC_{50} : 0,19 mM) (siehe Abb. 3.37).

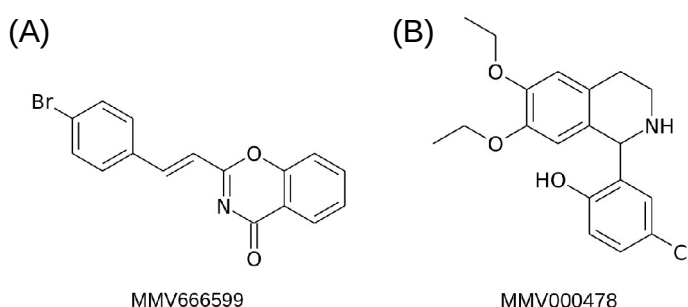


Abb. 3.37: Inhibitoren der PfNaMNAT aus der Malaria Box.

Durch *screening* der MMV Malaria Box wurden zwei Substanzen gefunden, die eine moderate Hemmung der PfNaMNAT hervorgerufen haben. Die Abbildung wurde anhand der SMILES-Codes, der die Malaria Box begleitenden Daten erstellt.

3.3 Kristallisation von Plasmoredoxin

3.3.1 Expression und Reinigung von Plrx

Das redoxaktive Protein Plasmoredoxin (Plrx) wurde erstmals 2003 von Becker *et al.* beschrieben [116]. Seit dieser Zeit erfolgten weitere Studien dieses Proteins [146][147], es entzog sich jedoch seit seiner Erstbeschreibung kontinuierlich der Kristallisation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde schließlich ein erneuter Versuch unternommen, eine adäquate Kristallisationsbedingung zu identifizieren.

Das 22 kDa große Protein wurde mit dem bereits zuvor beschriebenen Expressionssystem von Qiagen, bestehend aus *E. coli* M15-Zellen und dem pQE30 Plasmidvektor, produziert [116]. Das rekombinante Protein war dabei mit einem N-terminalen His₆-Tag versehen worden und konnte so über eine Affinitätschromatographie auf Ni-NTA gebunden werden. Die Elution des Proteins erfolgte durch einen Imidazolgradienten, wobei es bereits in einem sehr hohen Reinheitsgrad gewonnen werden konnte (siehe Abb. 3.38). Für die Reinigung wurde ein Puffer

bestehend aus 300 mM NaCl und 50 mM Tris pH 8,0 verwendet. Im Fall der dargestellten Reinigung, die tatsächlich für die Kristallisation von Plrx genutzt wurde, kamen nur die 50er bis 200er Fraktionen für weitere Arbeitsschritte zum Einsatz. Die Reinheit des Proteins wurde hier anhand des Gels bereits auf über 95 % geschätzt.

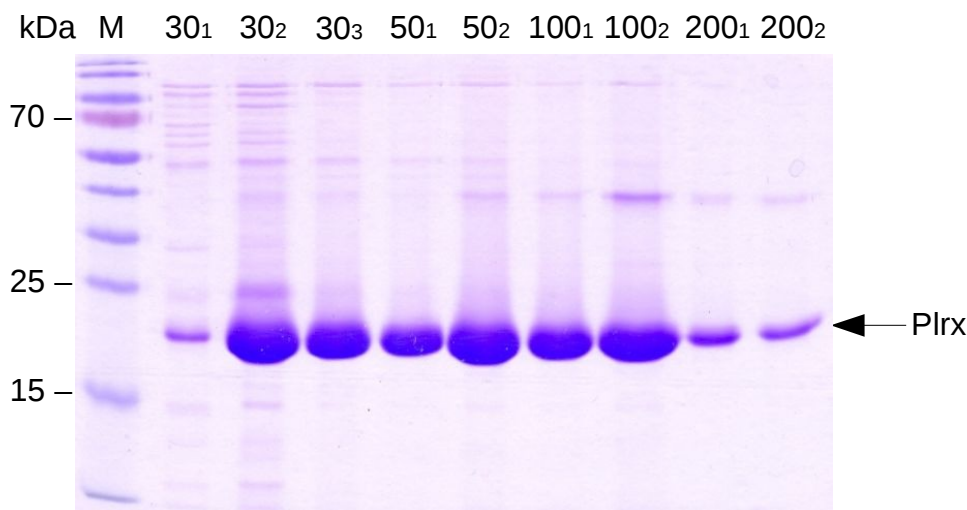


Abb. 3.38: Reinigung von Plrx mittels IMAC.

Das ca. 22 kDa große Plrx konnte bereits durch Ni^{2+} -Affinitätschromatographie in einer sehr reinen Form erhalten werden. Die Elution erfolgte in einem Imidazolgradienten (von 30 bis 200 mM), wobei von jeder Konzentration mehrere Fraktionen gesammelt wurden (erkennbar an den Indices).

3.3.2 Analyse des Oligomerisierungsstatus und Optimierung der Reinigung

Direkt nach der Reinigung lag Plrx bereits in einer für die Kristallisation genügend hohen Reinheit vor. Die Abschätzung der Proteinreinheit über eine denaturierende SDS-PAGE ist jedoch nicht hinreichend um die konformationelle Homogenität eines Proteins zu beurteilen. Ganz im Gegenteil geht bei einer denaturierenden Gelelektrophorese eine Vielzahl für die Kristallisation gewinnbringender Informationen verloren. Mittels Größenausschlusschromatographie wurde daher der Oligomerisierungsstatus von Plrx genauer evaluiert (siehe Abb. 3.39 (A)). Hierbei stellte sich heraus, dass Plrx primär in zwei Hauptmaxima eluierte. Es lag also ein inhomogenes Gemisch verschiedener Proteinkomplexe vor. Da zu erwarten stand, dass sich auch nach einer Trennung der Fraktionen ein erneutes Gleichgewicht zwischen den Aggregaten einstellen würde, musste die Reinigung überarbeitet werden. Hier wurde wiederum der Zusatz des Reduktionsmittels TCEP getestet (1 mM). Dieses Vorgehen war im Verlauf weiterer Reinigungen erfolgreich, es ergab sich nur noch ein einzelnes Elutionsmaximum im Chromatogramm (siehe Abb. 3.39 (B)).

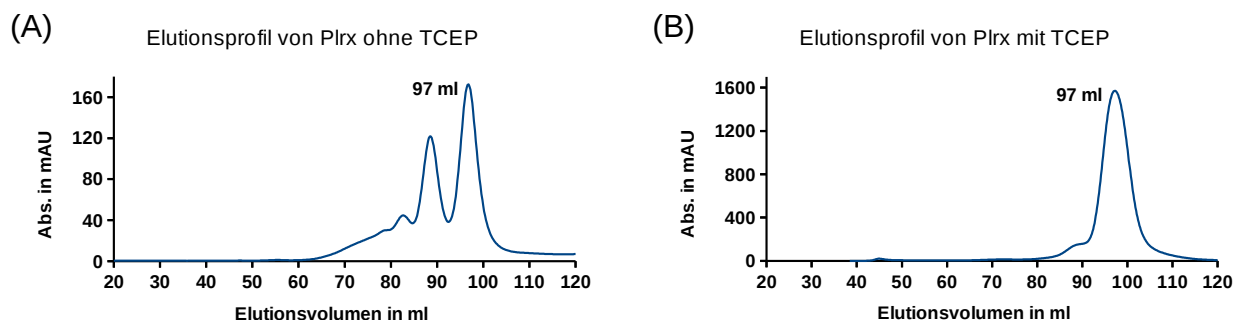


Abb. 3.39: Chromatogramm zur Gelfiltration von Plrx.

Trotz einer, ausgehend von einer Analyse mittels SDS-PAGE, hohen Reinheit, eluiert Plrx in zwei Hauptmaxima (B). Es liegen somit verschiedene Proteinaggregate vor. Durch den Zusatz von TCEP konnte ein homogener Dimerisierungsstatus erzielt werden (B). Plrx eluiert in Form eines Monomers. Für (B) wurden die Fraktionen 30₃ – 200₂ aus Abb. 3.38 herangezogen.

An die Gelfiltration schloss sich eine weitere SDS-PAGE an (siehe Abb. 3.40). Hierdurch erfolgte eine abschließende Bewertung des Reinheitsgrades. Die ersten Fraktionen wurden aufgrund einer zusätzlichen Bande mit einer Größe von ca. 40 kDa verworfen und nur die Fraktionen 47-52 vereinigt. Die Reinheit der Proteinlösung wurde auf über 99 % geschätzt. Die endgültige Ausbeute lag bei 600 µl mit 34 mg/ml, wobei diese Menge aus drei Litern einer LB-Kultur erhalten worden war.

Abb. 3.38, 3.39 (B) und 3.40 zeigen die sukzessive Proteinpräparation, mit welcher tatsächlich ein Plrx-Kristall herangezogen werden konnte.

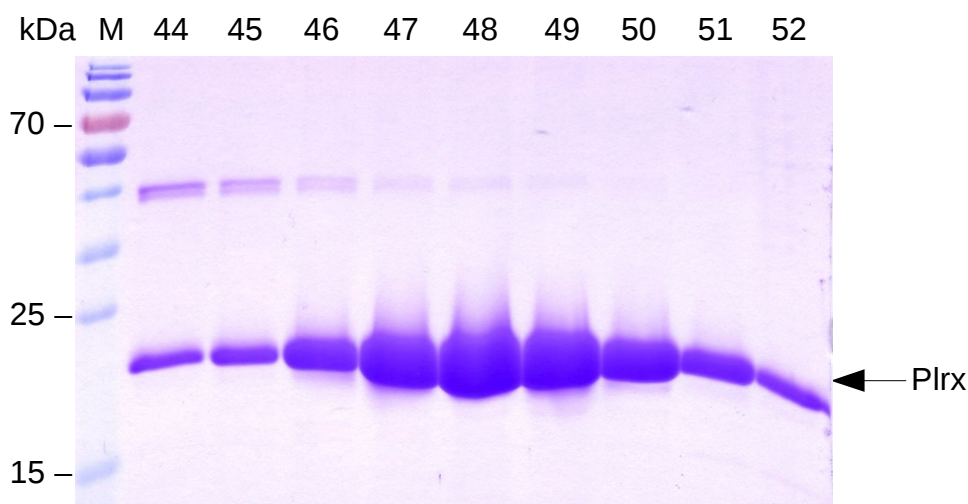


Abb. 3.40: SDS-Page zur Gelfiltration von Plrx.

Durch die zusätzliche Gelfiltration konnten die Homogenität und Reinheit von Plrx maximiert werden. Die Reinheit der Fraktionen 47 und nachfolgend kann auf mindestens 99 % geschätzt werden. Diese SDS-PAGE wurde mit dem Protein aus Abb. 3.39 (B) erstellt.

3.3.3 Kristallisation von Plrx

Im Anschluss an die Optimierung der Reinigung erfolgten erste Kristallisationsversuche. Hier wurde wiederum ein automatisiertes *screening* mit dem Kristallisationsroboter HoneyBee durchgeführt. Es kamen sämtliche im Haus vorhandenen Kristallisations-*screens* zum Einsatz, in der Summe sind dies vierzehn. Zunächst wurde hierbei eine Konzentration von 19 mg/ml getestet, was sich in einer Größenordnung von bereits zuvor genutzten Konzentrationen bewegte. Trotz dieser bereits relativ hoch angesetzten Proteinkonzentration konnte nur in den wenigsten Bedingungen ein Präzipitat vorgefunden werden. Nach einigen Tagen wurden die Kristallisationsansätze schließlich über ein Wochenende in einem Brutschrank bei 30 °C inkubiert, um so die Diffusion und damit einhergehend auch die Präzipitation und evtl. Kristallisation zu fördern. Zuvor waren die Platten bei Raumtemperatur gelagert worden. Die Temperaturerhöhung erbrachte jedoch keinen Erfolg. Da die Proteinkonzentration somit noch weit von einer Sättigung entfernt war, wurde ein neuer Kristallisations-*screen* mit 30 und 40 mg/ml durchgeführt. Außerdem wurde ein *seeding*-Ansatz mit Polystyrolnanosphären bei 30 mg/ml erstellt. Auch wenn bei einer Proteinkonzentration von 30 mg/ml noch relativ wenig ausfiel, fanden sich bereits einige vielversprechende Bedingungen. Darunter konnte bereits nach einem Tag ein kleiner Kristall in dem *screen* JCSG II well D6 (0,1 M Natriumcitrat pH 5,5, 40 % PEG 600) identifiziert werden (siehe Abb. 3.41 (A)). Dieser Kristall wuchs in den drei folgenden Tagen noch weiter und erreichte seine endgültigen Dimensionen, die in Abb. 3.41 (B) zu erkennen sind. Auch innerhalb der *seeding*-Ansätze konnte in dieser Bedingung ein kleiner Kristall gefunden werden (siehe Abb. 3.41 (C)). Insgesamt wurden annähernd 5000 Kristallisationsbedingungen getestet.

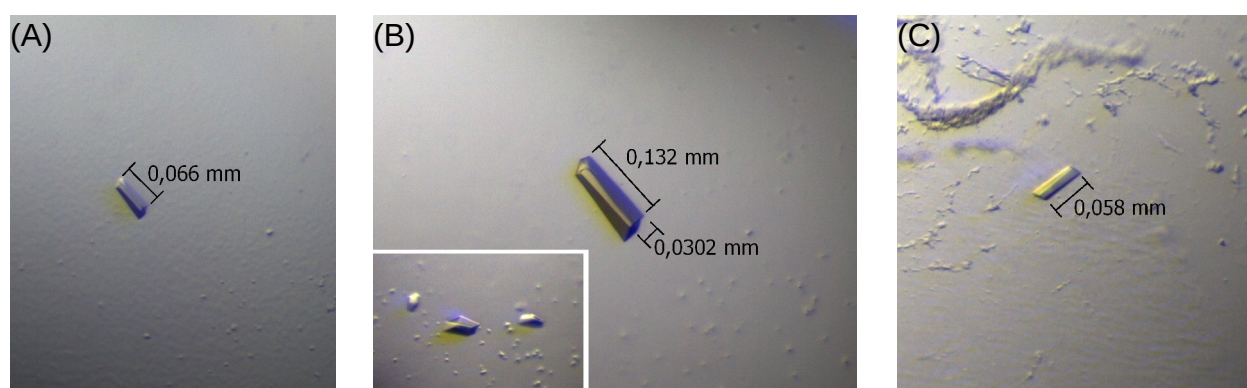


Abb. 3.41: Im *sitting drop*-Verfahren erhaltene Plrx Kristalle.

Plrx konnte in einem 400 nl Volumen kristallisiert werden. Dazu war eine Proteinkonzentration von 30 mg/ml nötig. Trotzdem ist kein deutliches Präzipitat zu verzeichnen. Man kann anhand des strukturierten Untergrundes ein überwiegend klares gelatinöses Präzipitat erkennen (A und B). Das in (C) aufgetretene Präzipitat stammt von den Polystyrolnanosphären des hier genutzten *seeding*-Verfahrens. Der Kristall aus (A) ist ca. einen Tag nach dem Erstellen des Ansatzes gewachsen. In (B) ist er bereits vier Tage alt und hat seine endgültigen Dimensionen erreicht. In dem gleichen Tropfen trat noch ein weiterer kleinerer Kristall auf.

Die in Abb. 3.41 (B) gezeigte Kristallisationsbedingung ist ein Lehrbuch-haftes Beispiel für die Proteinkristallisation. Der Proteinkristall ist in einem klaren gelartigen Präzipitat herangewachsen. Die darin befindlichen kleinen definierten Punkte dürften den Übergang zu Mikrokristallen darstellen, aus denen schließlich in einem Fall der endgültige große Plrx-Kristall hervorgegangen ist. Da auch in dem *seeding* Ansatz ein Kristall herangewachsen ist, kann man erkennen, dass der Zusatz der Nanosphären keinen negativen Einfluss auf die Kristallisation ausgeübt hat.

Mit der so gefundenen Bedingung wurde auch ein Handansatz mit 40 mg/ml Plrx erstellt und die Ursprungsbedingung leicht variiert. Der Kristall konnte jedoch hierbei nicht reproduziert werden. Dies könnte an den nicht linearen Skalierungseffekten, die mit der Verzehnfachung des Volumens einhergehen, liegen. Letztlich lieferte der Kristall aus Abb. 3.41 (B) jedoch durch die Analyse mit Synchrotronstrahlung am SLS einen vollständigen Datensatz. Die Datenauswertung steht gegenwärtig noch aus. Da Plrx exklusiv in Malariaparasiten auftritt [116], ist keine Struktur eines direkt orthologen Proteins bekannt. Ob eine Lösung des Phasenproblems durch molekularen Ersatz zu erzielen sein wird, kann daher noch nicht abgesehen werden. In jedem Fall dürfte es sich jedoch als schwierig erweisen. Die Suche nach einem angemessenen Template mit dem automatischen Modus von SWISS-MODEL erbrachte zwar eine Liste mit mehreren Treffern, allerdings wies selbst der beste Treffer hierbei nur eine Sequenzidentität von 25,58 % auf. Dabei handelt es sich um die Thioredoxin Peroxidase 2 (PDB-Code 2C0D). Darüber hinaus wurden mit SWISS-MODEL einige Homologiemodelle erstellt, bei denen gezielt verschiedene Strukturen als Vorlagen angegeben wurden. Da Plrx zur Thioredoxin-Superfamilie gehört, könnten hier noch weitere verwandte Proteine gezielt zum Erstellen eines Homologiemodells herangezogen werden. Tab. 7 gibt einen kurzen Überblick und listet die wichtigsten Eckdaten der erhaltenen Modelle auf. Die Modelle müssten im nächsten Schritt als Suchmodell innerhalb des Pattersonraumes verwendet werden. Sollte dies keinen Erfolg bringen, so verbliebe als Option, die Phase über isomorphen Ersatz zu bestimmen, wofür ein Schweratom-haltiger isomorpher Derivatkristall von Plrx erstellt werden müsste.

Tab. 7: Liste potentieller Homologiemodelle zu Plrx.

PDB-Code Vorlage		SeqIdent.	SeqSimil.	Bereich	Abdeckung	GMQE
4J57	Thioredoxin 1 (Kette F)	31,43 %	37 %	78 – 160	39 %	0,34
3CXG	Thioredoxin 3 Fragment	36,73 %	39 %	28 – 142	55 %	0,50
2H01	Thioredoxinperoxidase I	27,07 %	35 %	33 – 168	75 %	0,57
2AV4	Thioredoxin ähnliches Protein 4A	31,19 %	37 %	41 – 165	61 %	0,51
2C0D	2-Cys Peroxiredoxin	37,90 %	39 %	34 – 166	69 %	0,60
1XIY	1-Cys Peroxiredoxin	37,82 %	39 %	36 – 159	66 %	0,60

3.4 Kristallisation von PfGR

Die Glutationreduktase des Malariaparasiten *P. falciparum* (PfGR) gilt als attraktives Ziel für die Medikamentenentwicklung. Ihre Kristallstruktur und damit einhergehend auch ihre Kristallisation wurden erstmals 2003 bis zu einer Auflösung von 2,6 Å beschrieben [148]. Bei diesem homodimeren Flavoenzym handelt es sich um eine Disulfidreduktase, die für die Redoxhomöostase des Parasiten essentiell ist. Im Rahmen einer Kooperation waren unter 170.000 Substanzen mittels eines *high-throughput in silico docking* zwei potentielle neuartige Inhibitor der PfGR identifiziert worden. Ein Wirksamkeitstest einer strukturell nahe verwandten Substanz (MPDI 21618) erfolgte an der rekombinanten PfGR. In einem Nebenprojekt dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, eine Cokristallisation der PfGR mit diesem Inhibitor durchzuführen. So sollte der Wirkmechanismus im Detail analysiert werden. Für die Cokristallisation wurde das zuvor verwendete Kristallisationsprotokoll herangezogen. Eine vorhandene Präparation der PfGR wurde für 3 Stunden gegen 2 mM EDTA pH 7,0 dialysiert. Die Kristallisation erfolgte im *hanging drop*-Verfahren bei Raumtemperatur, wobei 2 µl der Proteinlösung mit 2 µl des Fällungsmittels vereinigt wurden. Das Fällungsmittel wies folgende Ausgangszusammensetzung auf: 14 % PEG-MME 550, 70 mM NaCl, 70 mM Bicin pH 8,8. Letztlich wurden die PEG-Konzentration in 2 %-Schritten von 10 bis 20 % variiert und die Proteinkonzentration in 2 mg/ml-Schritten von 8 bis 14 mg/ml. Da der Inhibitor selbst ein Kupferion in einer Komplexbindung aufweist, wurde noch ein alternativer Kristallisationsansatz erstellt, um zu verhindern, dass das Kupferion durch EDTA komplexiert wird. Die Kristallisation entsprach der vorausgehenden, PfGR wurde jedoch gegen 50 mM HEPES pH 7,0 dialysiert. In beiden Fällen konnten Proteinkristalle erhalten werden (siehe Abb. 4.1). Die erhalten Kristalle lieferten verwertbare Beugungsdaten bis zu einer Auflösung von 2,9 Å. Dabei konnten sogar Bereiche dargestellt werden, für die zuvor keine hinreichende Elektronendichte gegeben war. Dies sind die Aminosäuren 114 – 122, 136 – 139, 317 – 336 und 344 – 346. Der Inhibitor war jedoch nicht gebunden. Die Cokristallisation war nicht erfolgt.

Nichtsdestotrotz erbrachte die Kristallisation der PfGR einige sehr interessante, wenn nicht sogar ungewöhnliche Resultate. Wie man an den Aufnahmen aus Abb. 4.1 erkennen kann, weisen die Kristalle der PfGR eine bemerkenswerte Form auf. Für einen Kristall ist es atypisch, dass keine definierten Kanten und Flächen auftreten. Die Kristalle lassen sich eher als linsenförmig, oval, teils sogar bis hin zu rund beschreiben. Dies ist so außergewöhnlich, dass anfangs sogar vermutet wurde, dass hier nur eine Aggregation respektive Phasentrennung in Tropfen erfolgt wäre. Tatsächlich lagen jedoch Festkörper vor, wie ein Test mit einer Nadel hervorbrachte. Dies geht sogar so weit, dass die Kristalle selbst das Austrocknen des Tropfens an der Luft überstanden und dabei sogar ungewöhnlich rigide gegen mechanische Einflüsse waren. Ein erstes Indiz, dass es sich um Proteinkristalle handelte, kann man Abb. 3.42 (C) entnehmen. Die Kristalle liegen

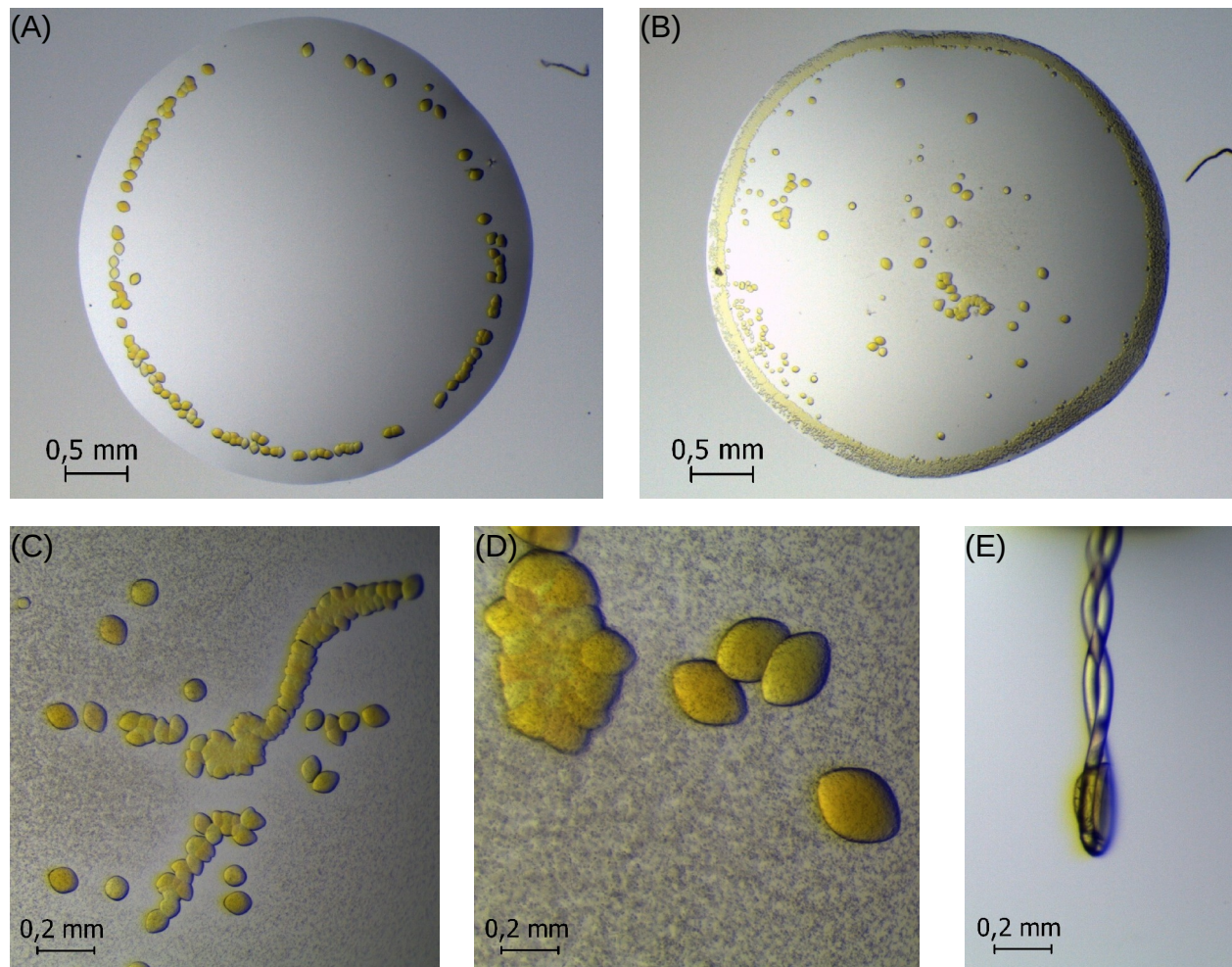


Abb. 3.42: Verschiedene Proteinkristalle der *P. falciparum* Glutathionreduktase.

Bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml war der Kristallisationstropfen bis auf die Kristalle selbst klar (A und B). Bei einer höheren Proteinkonzentration von 14 mg/ml waren die Kristalle dagegen von einem Präzipitat umgeben (C und D). Der in einem *cryo loop* gefangene Kristall lässt erkennen, dass eine flache Seite vorliegt (E).

innerhalb eines Präzipitats vor. Allerdings ist rund um die Kristallansammlungen deutlich weniger Präzipitat vorhanden. Es liegt sozusagen ein Präzipitat freier Halo vor. Hier muss das Protein aus der Lösung zum Kristallwachstum beigetragen haben, es fehlte somit für die Ausbildung des Präzipitats. Interessant ist auch, dass die Kristalle in einem bräunlichen Präzipitat gewachsen sind. Für gewöhnlich geht man bei braunem Präzipitat davon aus, dass das Protein denaturiert ist und somit nicht zu einem Kristallwachstum beitragen sollte. Da die PfGR jedoch ein Flavoprotein ist, kann die Farbe des Präzipitats jedoch auch eine intrinsische Eigenschaft des Proteins selbst sein. Anhand von Abb. 3.42 (E), welche einen Kristall in einem *cryo loop* zeigt, erkennt man, dass die Kristalle jedoch nicht perfekt rund sind. Sie weisen eine flache Seite auf. In der Abbildung ist dies die rechte Seite. Weniger erstaunlich ist dagegen die gelbe Farbe der Kristalle, da es sich bei der PfGR, wie erwähnt, um ein Flavoprotein handelt.

4 Diskussion

4.1 Zur Kristallisation von Proteinen und der PfNaMNAT im Besonderen

Der methodische Fokus dieser Arbeit wurde auf die Strukturbiologie gelegt. Diese äußerst diverse Disziplin umfasst dabei eine Vielzahl von Teilaspekten, es sind dies Klonierung, Expression, Reinigung, Kristallisation, Datenerfassung und -auswertung sowie eine abschließende Interpretation der Struktur. Auch wenn bei jedem dieser Arbeitsschritte eigene Probleme auftreten können, so gilt das Züchten von adäquaten Protein-Einkristallen als einer der wesentlichen Schlüsselpunkte bei der Strukturbestimmung eines biologischen Makromoleküls [149][150][122]. Hier konnte die *ab initio* Kristallisation zweier Proteine erzielt werden. Dass die Proteinkristallisation den wesentlichen Flaschenhals in der Strukturbestimmung darstellt, kann man daran erkennen, dass bereits alleine im Fall der PfNaMNAT ca. 15.000 Kristallisationsansätze erstellt wurden. Darüber hinaus wurde Plasmoredoxin von *P. falciparum* *de novo* kristallisiert. Auch hier stellte die Kristallisation einen Flaschenhals dar, denn es waren in der AG Becker bereits seit mehreren Jahren Kristallisationsbestrebungen unternommen worden. Ein universelles Protokoll, um streuungsfähige Kristalle zu erhalten, kann nicht entwickelt werden, da jedes Protein distinktive chemische Eigenschaften aufweist [150]. Daher basiert die Kristallisation nach wie vor primär auf der experimentellen, jedoch planvollen Suche nach einer angemessenen Kristallisationsbedingung für das jeweilige Protein. Ob die Kristallisation gelingt oder scheitert, kann jedoch bereits im vorausgehenden Schritt entschieden werden. Die Basis für eine erfolgreiche Proteinkristallisation wird bereits während des Reinigungsschrittes gelegt. Das Protein muss höchst rein, konformationell homogen und monodispers sein [151] [150]. Dieser Arbeitsschritt erwies sich als entscheidend für die Kristallisation von Plrx. Trotz eines vordergründig exzellenten Reinheitsgrades im SDS-Gel konnte durch Größenausschlusschromatographie enthüllt werden, dass das Protein keinen einheitlichen Oligomerisierungsstatus aufwies (siehe Abb. 3.39 Seite 117). Aus kristallographischer Sicht kam dies einem Gemisch aus zwei verschiedenen Proteinen gleich. Das Biochemiker-Sprichwort „*Do not waste clean thinking on dirty enzymes!*“ (Efraim Racker, Arthur Kornberg [152]) ist somit in besonderem Maße für die Proteinkristallisation zu befolgen. Da zelluläre Proteine in einem reduktiven Milieu vorliegen, kann TCEP oder ein anderes Reduktionsmittel, zu deutlichen Verbesserungen bezüglich der konformationellen Homogenität der Proteine beitragen. Dies gilt sowohl für Plrx als auch für NaPRT. Bei PfNaMNAT wurde es ausgehend von initialen kinetischen Untersuchungen ohnehin stets zugesetzt. Die optimierte Reinigung von Plrx bereitete

schließlich den Weg für die spätere Kristallisation des Proteins. Durch die Variation der Proteinkonzentration konnte letztlich eine angemessene Kristallisationsbedingung identifiziert werden.

Bei der Strukturbestimmung der PfNaMNAT waren zwei primäre Probleme zu überwinden. Dies waren zum einen die Proteinkristallisation selbst und zum anderen die Bestimmung der Phaseninformation. Die meisten der in der PDB hinterlegten Strukturen wurden durch molekularen Ersatz aufgeklärt. Dabei muss das Suchmodell zwei Bedingungen erfüllen: es muss mindestens 50 % der Gesamtstruktur abdecken und die RMSD-Werte der C α -Atome zwischen Modell und letztlcher Struktur dürften 2 Å nicht überschreiten. Außerdem fällt die Erfolgsrate beträchtlich ab, wenn die Sequenzidentität zwischen Vorlagenprotein und Zielstruktur unter 35 % liegt [153]. Somit waren denkbar schlechte Voraussetzungen für die Bestimmung der Phase gegeben. Zwischen Homologiemodell und Vorlagenprotein bestand, ausgehend von dem durch SWISS-MODEL erstellten Alignment, nur eine 28 %-ige Sequenzidentität. Letztlich zeigte sich, dass die RMSD-Werte noch im Rahmen des Nutzbaren lagen (siehe Tab. 8).

An dieser Stelle soll daher noch einmal ein Vergleich zwischen Homologiemodell respektive Suchmodell und dem finalen Modell der PfNaMNAT erfolgen (siehe Abb. 4.1 aber auch die jeweiligen separaten Darstellungen des Homologiemodells in Abb. 3.12 S. 77 und der PfNaMNAT in Abb. 3.17 S. 85). Das zentrale Motiv der Rossmann-Falte stimmt gut mit den letzten Gegebenheiten überein. Da dies eine stark konservierte Supersekundärstruktur darstellt, ist dies jedoch wenig überraschend. In oberflächlichen Regionen (z.B. 130 – 156) sowie den C-terminalen Helices ergeben sich dagegen größere Abweichungen. Dies gilt in besonderem Maße für jene Sequenzabschnitte, welche innerhalb des Suchmodells entfernt wurden. Hier wurde somit korrekt abgeschätzt, dass die Modellierungsqualität fragwürdig ist.

Tab. 8: Mit Coot berechnete RMSD-Werte der PfNaMNAT mit dem Homologiemodell.

Vergleichsstruktur	RMSD (Å)	Anzahl der C α -Atome	Sequenzidentität (%)	Lücken
Homologiemodell	1,79	172	91,28	12
Suchmodell	1,70	148	93,24	8
Sa 2H29	1,73	169	27,22	10

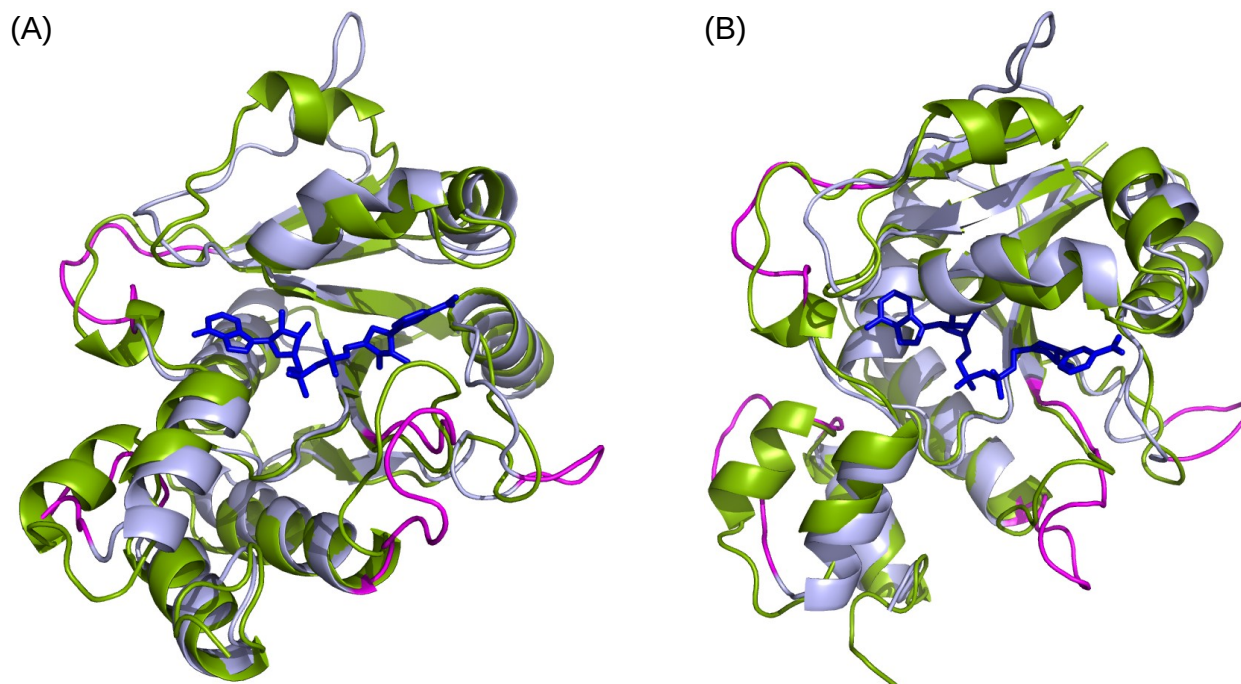


Abb. 4.1: Vergleich der NaAD-haltigen PfNaMNAT-Struktur mit dem Homologiemodell.

Die letztlich von der PfNaMNAT erhaltene Struktur ist grün dargestellt, das Homologiemodell in Pastellblau. Eliminiert man die pinken Schleifen des Homologiemodells, so erhält man das letztlich verwendete Suchmodell. Das Produkt NaAD ist im aktiven Zentrum in einer dunkelblauen Stickdarstellung zu erkennen. Die Abbildung wurde mit PyMol erstellt.

Im Vergleich von Homologiemodell und finaler Struktur wird auch eine weitere Problematik verdeutlicht, warum eine Bestimmung der Phaseninformation schwierig war. Es lagen einige Sequenzverschiebungen, sog. *shifts*, vor, durch die zwar die C α -Atome der Aminosäuren identische Positionen einnahmen, jedoch die falschen Seitenketten an einer gegebenen Position auftraten. So sind z.B. Ser72 des Homologiemodells und Lys77 der finalen Struktur, sowie nachfolgende Aminosäuren, an identischer Position zu finden. In diesem Bereich tragen die Seitenketten daher zu einer falschen Information für die Elektronendichte bei, auch wenn das Rückgrat korrekt ist. Derartige Abweichungen werden durch die RMSD-Werte gar nicht berücksichtigt, ihre Auflösung trägt jedoch maßgeblich zum Lösen der Struktur bei. Die Summe der einzelnen Faktoren, aus entfernten Sequenzabschnitten, gänzlich fehlerhaften Bereichen sowie Sequenzverschiebungen, führte letztlich dazu, dass ca. 30 % des Homologiemodells fehlten oder falsch waren.

Mittels der durch die Struktur der PfNaMNAT gewonnenen Erkenntnisse ist es letztlich auch möglich, einige Mutmaßungen dazu aufzustellen, warum sich das Protein der Kristallisation widersetzte. Im Vergleich der B-Faktoren orthologer NaMNATs (siehe Abb. 3.29 und 3.30 S. 102f) fallen die relativ hohen Temperaturfaktoren der PfNaMNAT auf. Andere NaMNATs zeigen hier deutlich kältere Oberflächen. Dies geht einher mit einer verminderten thermischen

Beweglichkeit und somit rigideren Oberfläche. Da eine möglichst konsistente Struktur der Proteine Prämisse für die Kristallisation ist, bedingt diese Flexibilität eine eher hohe konformationelle Heterogenität. Eine hohe Beweglichkeit weist dabei der Loop im Bereich der Aminosäuren 43 bis 48 auf, so dass diese Aminosäuren in der APC-haltigen Struktur gar nicht zu erkennen sind. Wie bereits ausgeführt wurde, sind andere NaMNATs häufig Dimere oder Oligomere. Hier sind somit natürliche Kontaktflächen, an denen sich die Proteine anlagern, gegeben. Ein Dimerisierungsinterface kann natürlich auch zur Stabilisierung der Struktur beitragen. Dies ist bei der monomeren PfNaMNAT daher ebenfalls nicht gegeben. Bei größeren Komplexen, wie eben Oligomeren, wäre es darüber hinaus denkbar, dass mehr intermolekulare Kontakte bestehen, welche den Zusammenhalt insgesamt fördern. Die Summe dieser Faktoren dürfte die Kristallbildung sicherlich erschwert haben. Der letztlich entscheidende Punkt ist jedoch in der Substratbindung zu sehen. Wie im weiteren noch dargelegt werden wird, ist davon auszugehen, dass hierbei eine Konformationsänderung der PfNaMNAT erfolgt. Erst durch Zusatz eines der Substrate respektive des Produkts konnte die Konformation stabilisiert werden. Verifiziert wird dies auch durch die Wilson B-Faktoren, der beiden PfNaMNAT-Strukturen. Für die APC-Struktur liegt dieser Wert bei ca. 50 \AA^2 , für die NaAD-Struktur dagegen bei ca. 34 \AA^2 . Die NaAD-haltige Struktur, mit dem größeren Substrat, zeigt somit eine höhere Rigidität als ihr APC-haltiges Gegenstück. Diese Fakten lassen sich auch anhand der im Verlauf der Kristallisation gemachten Erfahrungen nachvollziehen. Die initialen Kristalle konnten nur bei dem Zusatz eines α/β -nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogons erhalten werden. Bei Zusatz von β/γ -nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga wurden diese Kristalle nicht erhalten. Dies ist auch konsistent mit dem Faktum, dass im Verlauf der Katalyse tatsächlich ein Pyrophosphat abgespalten wird. Es erfolgt also eine Hydrolyse zwischen α - und β -Phosphat des ATP. PfNaMNAT ist vermutlich chronisch heterogen, wenn kein Produkt oder Substrat gebunden ist. Verbunden mit der ohnehin hohen Flexibilität des Proteins war die Kristallisation somit äußerst kompliziert, denn „wackelnde Proteine kristallisieren nicht gut“.

Der für das Kristallwachstum entscheidende Punkt war somit die Stabilisierung der Struktur durch Besetzung des aktiven Zentrums. Sollte sich in Zukunft erweisen, dass noch eine andere Variante des Proteins, z.B. die Apo-Struktur, kristallisiert werden sollte, so bestünde nun die Option des *cross-seeding* [150]. Die Keimbildung könnte so durch die mittels Substrat bzw. Produkt stabilisierten Proteine erfolgen und evtl. das Kristallwachstum mit einer anderen Proteinvariante ermöglichen. Dadurch wäre eine epitaxiale Keimbildung ermöglicht, die eine Kongruenz der Kristallgitter, zumindest in zwei Dimensionen, benötigt. Für identische Proteine dürfte dies erfüllt sein [122].

4.2 Der mutmaßliche Katalysemechanismus der PfNaMNAT

Generell zählt NaMNAT zu der Nukleotidyltransferase- α/β -phosphodiesterase Superfamilie [136][132]. Charakteristisch für diese Enzymfamilie ist die Rossmann-Falte [132][134]. Wie in Abschnitt 3.2.3.2 S. 89 gezeigt werden konnte, gilt dies auch für die PfNaMNAT. Bei der Rossmann-Falte handelt es sich um eine Dinukleotidbindefalte, welche aus zwei kleineren Einheiten besteht, welche jeweils für die Bindung eines Mononukleotids verantwortlich zeichnen [130]. Diese strukturelle Grundlage ist somit konsistent mit der eigentlichen Funktion von NaMNAT, es ist dies die Verknüpfung der beiden Mononukleotide ATP und NaMN respektive NMN zu einem Dinukleotid (NaAD oder NAD). Es wird davon ausgegangen, dass die durch NaMNAT und andere Mitglieder der Superfamilie katalysierte Reaktion durch einen nukleophilen Angriff des 5'-Phosphats des Mononukleotids an dem α -Phosphat des Triphosphats erfolgt [123][132][154]. Nach gegenwärtigen Erkenntnissen ist es evident, dass NaMNAT den bei der Katalyse auftretenden Übergangszustand stabilisiert, ohne dass eine kovalente oder Säure/Base-Katalyse involviert wäre [123][154]. Vielmehr schaffen bestimmte Aminosäuren eine Umgebung, welche den Übergangszustand stabilisiert und den elektrophilen Charakter des α -Phosphats erhöhen [154]. Für die *Methanococcus jannaschii* NaMNAT (MjNaMNAT) wurde beschrieben, dass das im aktiven Zentrum gebundene ATP-Molekül eine Biegung zwischen α - und β -Phosphat aufweist [154]. Diese Zusammenhänge scheinen auch für die PfNaMNAT erfüllt zu sein. In Abb. 4.2 wurden die beiden Strukturen der PfNaMNAT überlagert und so die Ausrichtungen des ATP-Analogons und des Produkts NaAD verglichen. Man erkennt die starke Biegung innerhalb des Triphosphats, so dass hier durchaus Raum geschaffen wird, um einen nukleophilen Angriff zu ermöglichen. Auch der NaMN-Anteil des Dinukleotids ist perfekt positioniert, um an dem α -Phosphat anzugreifen. Aufgrund der vielfachen negativen Ladungen, die das Triphosphat sowie das Monophosphat aufweisen, bedarf es noch eines Ladungsausgleichs. Für die MjNaMNAT wurde hier, neben der Beteiligung des Enzyms selbst, das Auftreten eines Mg^{2+} beschrieben, welches als Polarisator (Lewisbase) wirkt, der den nukleophilen Angriff begünstigt und das Pyrophosphat als Abgangsgruppe stabilisiert [154]. Bei der APC-haltigen PfNaMNAT Struktur konnte jedoch keine Dichte für ein derartiges Ion verzeichnet werden. Gleichwohl ist das Enzym in der Lage die gegebenen Ladungen zu stabilisieren. In diesem Zusammenhang kommt zwei Aminosäuren eine besondere Bedeutung zu. Abb. 3.26 (siehe S. 97) lässt erkennen, dass His20, welches Teil des T/HXGH-Motivs ist, über eine positive Ladung anziehend auf α - und β -Phosphat einwirken kann. Arg136 interagiert ebenfalls mit dem β -Phosphat. Die Relevanz von Arg136 wurde bereits untersucht. Die Mutante R133A der BaNaMNAT resultierte in einer Abnahme der Katalyseraten und K_M -Werte für beide Substrate. Es wird vermutet, dass das Arginin dabei hilft, die sich entwickelnde negative Ladung des Pyrophosphats als Abgangsgruppe zu neutralisieren und die Phosphorylsauerstoffbindung für

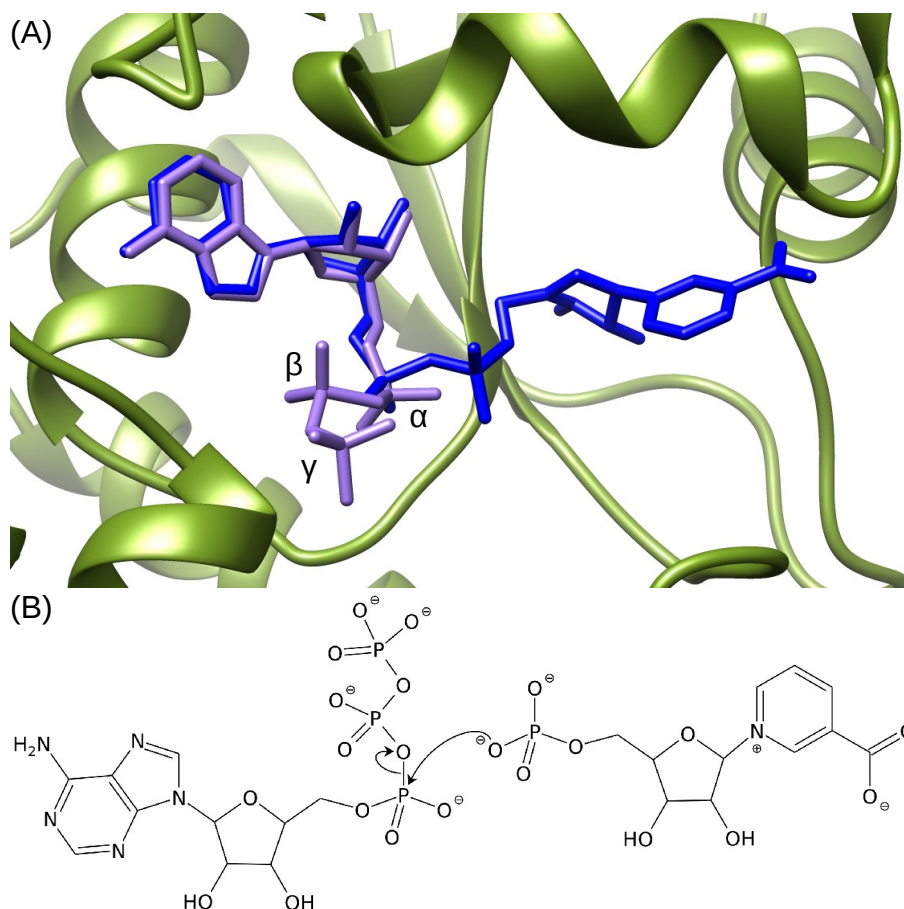


Abb. 4.2: Der mutmaßliche Reaktionsmechanismus der PfNaMNAT.

NaMNAT positioniert beide Substrate in optimaler Weise zu einander, sodass ein nukleophiler Angriff des Phosphats von NaMN an dem α -Phosphat von ATP erfolgen kann. Anhand der Strukturüberlagerung (A) ist ersichtlich, wie ATP (in diesem Fall das ATP-Analogon APC) hierfür in eine angemessene Konformation überführt wird. Die chemische Struktur (B) vollzieht die Reaktion nach und zeigt schematisch die Biegung zwischen α - und β -Phosphat. APC ist lila gefärbt, NaAD blau. APC- und NaAD-haltige Struktur wurden für die Abbildung überlagert, jedoch ist nur die PfNaMNAT der NaAD-Struktur dargestellt. (A) wurde mit Chimera erstellt, (B) mit GChemPaint.

den Elektronentransfer während der Katalyse ausrichtet [123]. Damit der nukleophile Angriff erfolgen kann, muss das ATP *quasi* verbogen werden. Die dafür nötige Energie wird durch eine Vielzahl von Interaktionen mit dem Enzym bereitgestellt. Hierbei dürfte dem Arginin selbst nicht nur über die Bindung des β -Phosphats eine entscheidende Rolle zukommen, sondern auch über die π - π -Wechselwirkung mit der Adeninbase. Weitere Aminosäuren, die zur Neutralisation der negativen Ladung beitragen könnten sind Arg172 im Anschluss an das ISST-Motiv sowie Arg44 und Lys47 innerhalb des Loops im Bereich des sonst üblichen PPHK-Motivs.

Letztlich erfolgt durch PfNaMNAT eine optimale Positionierung der Substrate zueinander, wobei ATP in eine für den nukleophilen Angriff zweckmäßige Konformation überführt wird. Schließlich werden noch die negativen Ladungen der Phosphate durch positiv geladene Aminosäuren neutralisiert. Die mutualistische Abstoßung zwischen den negativen Phosphaten

wird dabei minimiert. So ist es nur noch eine Frage der Annäherung und des chemischen Gleichgewichts, das eine neue Verbindung zwischen ATP und NaMN/NMN entsteht.

Da bei dieser Art der Katalyse kein substituiertes Enzym-Zwischenprodukt gebildet wird ist klar, dass keine Pingpong-Reaktion stattfindet. Es liegt also eine sequenzielle Verdrängung vor. Da innerhalb des aktiven Zentrums der PfNaMNAT bereits die Bindungsstellen für beide Substrate vorliegen und es keine Anzeichen dafür gibt, dass nicht beide Substrate unabhängig voneinander binden können, ist von einer zufälligen sequenziellen Bi-Bi-Reaktion auszugehen. Dieser Reaktionsmechanismus wurde auch für die BaNaMNAT vorgeschlagen [123].

Da die PfNaMNAT problemlos wieder das Produkt NaAD oder auch NAD innerhalb des aktiven Zentrums aufnehmen kann, dürften hier die Substrate mit dem Produkt um die Bindung konkurrieren. Es sollte somit eine kompetitive Hemmung durch das Endprodukt gegeben sein. Physiologisch erscheint dies sinnvoll, denn wenn genügend NAD in der Zelle vorliegt, wäre eine weitere Synthese nur mit Energieverschwendung in Form von ATP-Verbrauch korreliert. Um dies zu bestätigen, müsste noch eine weitere Michaelis-Menten-Kinetik gemessen werden, wobei jeweils eine definierte NAD-Konzentration vorgelegt wird. Sollte der K_M -Wert hierbei steigen wäre eine kompetitive Hemmung durch NAD verifiziert. Eine Hemmung durch NaAD wurde für die BaNaMNAT beobachtet [123]. Es ist höchst unwahrscheinlich, dass dies bei der PfNaMNAT nicht der Fall sein sollte.

4.3 Die Grundlage der Substratpräferenz der PfNaMNAT

NaMNAT wird basierend auf seiner Substratpräferenz in zwei Gruppen klassifiziert, es sind dies EC 2.7.7.1 sofern NMN präferiert wird (man spricht dann von NMNAT) oder EC 2.7.7.18 falls NaMN das bevorzugte Substrat darstellt (in diesem Fall ist die korrekte Abkürzung NaMNAT). Für verschiedene homologe NaMNATs respektive NMNATs wurde daher bereits die Substratpräferenz näher untersucht. Drei humane Isoformen des Enzyms konnten identifiziert werden. NMNAT-1 und NMNAT-3 weisen keine Präferenz gegenüber NaMN oder NMN auf. NMNAT-2 zeigte dagegen eine ca. zweifache Präferenz von NMN gegenüber NaMN [58]. Dagegen wurde eine starke Präferenz für die negativ geladene Nicotinsäuregruppe bei bakteriellen NaMNATs berichtet [123][155]. Sieht man sich die einzelnen orthologen Enzyme genauer an, so ergibt sich folgendes Bild: BaNaMNAT zeigt nur eine geringe bis keine Aktivität mit NMN [123]. Für BsNaMNAT wurde bei der Hinreaktion eine ca. 13.000-fache Präferenz für NaMN festgestellt. Die Rückreaktion wurde ebenfalls untersucht, wobei NaAD um einen Faktor von 2000 gegenüber NAD bevorzugt wurde [133]. Für *E. coli* wurde eine mindestens 20-fach höhere Adenylierungsrate für NaMN beschrieben [156]. Generell wird angenommen, dass eukaryotische sowie archeale NMNATs keine oder eine geringe Substratpräferenz für NaMN

aufweisen [133].

Angesichts der obigen Ausführungen ist davon auszugehen, dass die PfNaMNAT, da es sich bei *Plasmodium* um einen Eukaryoten handelt, beide Substrate nutzen kann. Bei der Struktur fällt jedoch auf, dass die PfNaMNAT den prokaryotischen Orthologen mehr ähnelt als dem humanen Gegenstück (siehe Abschnitt 3.2.3.3 S. 91). Um hier Klarheit zu erlangen, wurde ein diskontinuierlicher Assay etabliert und die Substratnutzung durch die PfNaMNAT sowohl für NaMN als auch NMN untersucht (siehe Tab. 6 S. 109). Die K_M -Werte sind hier für NaMN nur ca. halb so hoch wie für NMN. Dies ist konsistent für den Wildtyp sowie alle untersuchten Mutanten des Enzyms gegeben. Da der K_M -Wert jene Substratkonzentration angibt, bei welcher die Hälfte der aktiven Zentren besetzt ist, lässt sich leicht auf eine doppelt so hohe Affinität der PfNaMNAT für NaMN gegenüber von NMN schließen.

Was ist nun die strukturelle Basis, auf der diese Substratpräferenz beruht? Letztlich unterscheiden sich NaMN und NMN nur dadurch, dass die Carboxylgruppe an dem Pyridinring durch ein Carboxamid substituiert ist. Hiermit geht einher, dass eine negative Ladung durch eine weitaus neutralere Gruppe ersetzt wird. Auch das Potential zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken wird beeinflusst. Die Carboxylgruppe dient als doppelter Wasserstoffakzeptor, die Amidgruppe dagegen als Wasserstoffdonor. Außerdem weist das Carboxamid eine geringfügig größere Raumforderung auf. Welche dieser Eigenschaften nun einen Unterschied bei der Substraterkennung herbeiführt, soll hier durch eine genaue Betrachtung des aktiven Zentrums untersucht werden (siehe Abb. 4.3 und Abb. 3.27 S. 99).

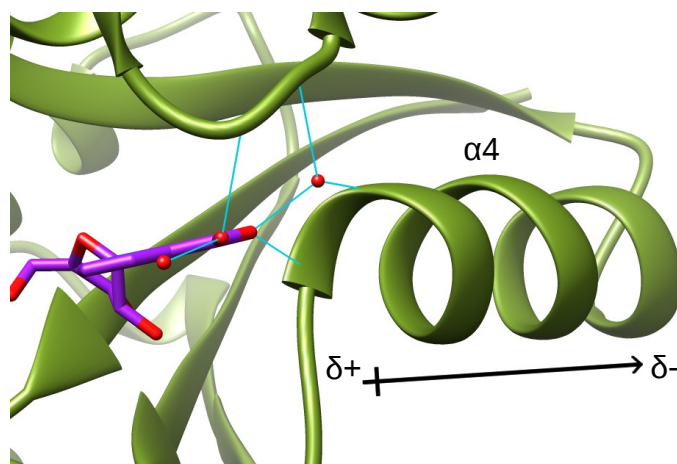


Abb. 4.3: Bindung der Carboxylgruppe durch PfNaMNAT.

Die PfNaMNAT bindet die Carboxylgruppe mittels mehrerer Wasserstoffbrückenbindungen. Eine davon wird indirekt durch ein konserviertes Wassermolekül vermittelt. Außerdem ist eine Wasserstoffbrücke zu dem Rückgratamid von Thr88 gegeben. Diese Aminosäure befindet sich am N-Terminus von Helix $\alpha 4$. Diese übt mittels ihres, an dieser Position, positiven Dipols eine Attraktion auf die Carboxylgruppe aus. Eine Amidgruppe könnte dagegen keine Wasserstoffbrücke zu Thr88 ausbilden. Die Abbildung wurde mit Chimera erstellt.

Sterische Kollisionen scheinen hier keine Rolle zu spielen, da innerhalb des aktiven Zentrums im Bereich der Nicotinsäure einige Wassermoleküle vorliegen, welche gegebenenfalls verdrängt werden könnten und generell genügend Flexibilität vorhanden sein sollte, um die geringfügig höhere Raumforderung des Amids zu kompensieren. Etwas anders verhält es sich dagegen mit den potentiellen Wasserstoffbrücken (siehe Abb. 4.3). Hier ist die Carboxylgruppe dazu in der Lage, eine H-Brücke zur Amidgruppe des Rückgrats von Thr88 auszubilden. Dies dürfte für ein Carboxamid nicht der Fall sein. Verbleibt als letztes Unterscheidungsmerkmal der beiden funktionellen Gruppen noch ihre Ladungseigenschaft. Warum die EcNaMNAT NaMN gegenüber von NMN präferiert, wurde bereits bei diesem Enzym anhand der Struktur untersucht [132].

Zhang *et al.* beschreiben, dass eine Anionenbindetasche durch die Rückgrat-Amidgruppen von Thr85, Tyr118 sowie den positiven Dipol der zu $\alpha 4$ analogen Helix aufgebaut wird (siehe Abb. 4.4 (B)). Diese Interaktionen werden als höchst diskriminierend zwischen Nicotinsäure und Nicotinamid dargestellt und somit als Grundlage für die Substratpräferenz angesehen [132].

Um diese Begründung nachvollziehen zu können, sollen hier die Bindungsstellen von Nicotinsäure respektive Nicotinamid anhand von PfNaMNAT, EcNaMNAT, humaner NMNAT-1 und NMNAT-3 untersucht werden. NMNAT-1 und -3 dienen dabei als Referenz, da beide Enzyme keine Substratpräferenz aufweisen [58]. PfNaMNAT sowie EcNaMNAT präferieren beide NaMN, die EcNaMNAT jedoch wesentlich stärker. Um Verwirrungen vorzubeugen, sei an dieser Stelle angemerkt, dass die Struktur der EcNaMNAT zwar NAD zeigt (1K4M) die Autoren jedoch in ihrer Publikation NaAD angeben und damit auch die Cokristallisation durchführten [132]. Es liegt somit ein Fehler in der PDB-Datei vor. Bei Betrachtung von Abb. 4.5 (B) ist daher zu berücksichtigen, dass eigentlich ein NaAD vorliegen sollte. Im direkten Vergleich ist leicht ersichtlich, dass PfNaMNAT (A) und EcNaMNAT (B) sowie NMNAT-1 (C) und NMNAT-3 (D) einander jeweils stark ähneln. NMNAT-1 und -3 binden das Carboxamid jeweils indirekt mittels zweier konservierter Wassermoleküle. Diese Wassermoleküle sind auch die Grundlage für die duale Substratspezifität beider Enzyme [157]. Da die Grundlage der Anionenbindetasche der positive Dipol der Helix sowie zwei Amidgruppen des Rückgrats sind, soll im Folgenden auf diese Interaktionen fokussiert werden. Bei allen vier dargestellten Enzymen fällt auf, dass die Carboxyl- oder Carboxamidgruppe immer an identischen Positionen in der Verlängerung der Achse analoger α -Helices liegen. Auch die Abstände des Substrats zur Amidbindung unterscheiden sich nicht signifikant (bei allen vier Enzymen handelt es sich hier übrigens um ein Threonin). Da die Interaktionen aller Enzyme mit dem Substrat auf der rechten Seite somit jeweils identisch ausfallen, kann dies kaum die Grundlage der Substratspezifität darstellen. Verbleibt somit nur noch die Interaktion auf der linken Seite, bei der EcNaMNAT eine H-Brücke zur Amidbindung von Tyr118 ausbildet. EcNaMNAT und PfNaMNAT bilden beide mit analogen Aminosäuren eine direkte H-Brücke zur Carboxylgruppe aus. Bei NMNAT-1 und -3 sind es

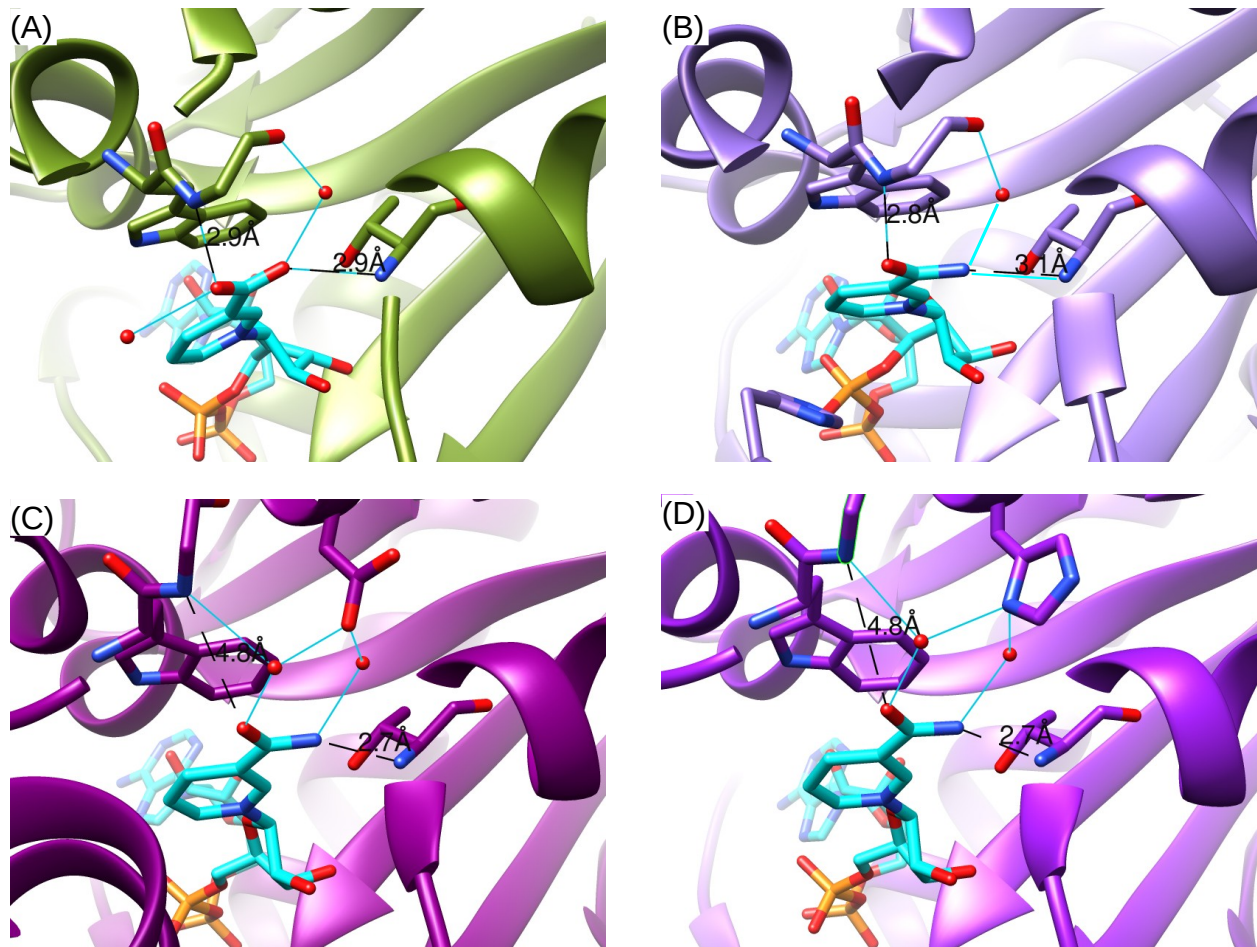


Abb. 4.4: Vergleich verschiedener Anionenbindetaschen.

PfNaMNAT (A) sowie EcNaMNAT (1KQN) (B) binden die Carboxylgruppe auf analoge Weise. Einander sehr ähnlich sind sich diesbezüglich auch humane NMNAT-1 (C) und NMNAT-3 (D). Der einzige wesentliche Unterschied aller vier Enzyme besteht in der Bindung des „linken“ Sauerstoffatoms der Carboxylgruppe bzw. des Carboxamids. Bei NMNAT-1 und -3 besteht hier eine indirekte Bindung über ein Wassermolekül. Zu (B) ist anzumerken, dass zwar ein NAD gezeigt ist, die Kristallisation jedoch mit NaAD erfolgte, es liegt ein Fehler in der PDB-Datei vor. Entsprechende H-Brücken wurden in der Abbildung nachträglich ergänzt. Für die Darstellung wichtiger Aminosäuren wurde die Cartoonpräsentation unterbrochen. Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt.

indirekte über Wasser vermittelte H-Brücken. Die Distanzen zum Rückgrat fallen hier dementsprechend auch um ca. 2 Å länger aus. Die Unterschiede reduzieren sich somit auf diese eine Interaktion. Diese alleine erscheint jedoch wenig geeignet um die teils gravierenden beobachteten Unterschiede innerhalb der Substratspezifität zu belegen. Eine geringe Substratpräferenz, wie sie bei der PfNaMNAT auftritt, mag aufgrund der Anziehung von Carboxylgruppe und positiven Dipol der Helix gerechtfertigt sein, jedoch kaum die besagte 20-fach höhere Adenylierungsrate der EcNaMNAT und erst recht nicht die 13.000-fach höhere Substratpräferenz der BsNaMNAT (BsNaMNAT und BaNaMNAT weisen eine der Ec- und PfNaMNAT identische Struktur auf, Daten nicht gezeigt). Ganz im Gegenteil sehen die

Strukturen sogar eher so aus, als wären sie auf eine duale Substratspezifität ausgelegt, denn auf Seiten der Aminogruppe des Carboxamids befindet sich in allen vier Enzymen ein konserviertes Wassermolekül, welches eben flexibel eine H-Brücke zu Sauerstoff oder Stickstoff vermitteln kann.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch ein Vergleich mit den von Dahmen *et al.* gemessenen K_M -Werten der EcNaMNAT [158]. Diese belaufen sich für NaMN auf 80 μM und für NMN auf 200 μM . Demnach wäre nur eine ca. 2,5-fach höhere Affinität für NaMN gegeben. Diese relativ geringe Präferenz steht in gutem Einklang mit der Struktur des Enzyms.

Letztlich lässt sich konstatieren, dass bei der PfNaMNAT und strukturell ähnlichen bakteriellen NaMNATs das positive Dipolmoment der Helix in einer höheren Affinität für die Carboxylgruppe resultiert. Auf struktureller Ebene ist somit tatsächlich eine stärkere Bindung für NaMN gegeben. In der Summe der Wechselwirkungen, welche für die Bindung des jeweiligen Mononukleotids verantwortlich zeichnen (siehe Abschnitt 3.2.3.4 S. 95ff), dürfte der Unterschied jedoch nur relativ gering ausfallen. Die Struktur steht daher im Einklang mit den bei der Kinetik gemessenen K_M -Werten. Die postulierte Anionenbindetasche, mit einer starken Präferenz für die Carboxylgruppe, erscheint dagegen nicht haltbar.

Ein letzter Grund warum NAD und nicht nur NaAD erkannt werden sollte, liegt in der besprochenen Produkthemmung der PfNaMNAT sowie allgemein aller NaMNATs. Eine Produkthemmung ist physiologisch sinnvoll, denn wenn bereits genügend NAD vorliegt, muss kein weiteres produziert werden. Wäre eine all zu hohe Präferenz für NaAD gegeben, so könnte diese Wirkung durch das eigentliche Endprodukt des Stoffwechselweges gar nicht erfolgen.

In einer Untersuchung des Metabolismus von *P. falciparum* wurde beschrieben, dass nicht infizierte Erythrocyten NAD vorzugsweise durch NMN erstellen, während der Parasit NAD durch den Preiss-Handler-Weg mit einem intermediären Schritt über NaAD erstellt [64]. Für die Untersuchung wurde ^{13}C -markiertes PRPP herangezogen und das Auftreten der Radioaktivität in den folgenden Produkten der NAD-Synthese, also NMN, NaMN, NaAD und NAD, bei infizierten und nicht infizierten Erythrocyten, beobachtet. Da sich die NMN-Konzentration im Verhältnis nur geringfügig veränderte, jedoch NaMN deutlich anstieg, wurde auf die Nutzung des Preiss-Handler-Weges geschlossen. Angesichts des Faktums, dass NMN durchaus von der PfNaMNAT umgesetzt werden kann, ist nicht garantiert, dass sich *P. falciparum* exklusiv auf diesen Weg beschränkt. Hier wäre es auch interessant gewesen, die absoluten Konzentrationen der einzelnen Zwischenprodukte zu erfahren, zumal tatsächlich ein Anstieg der NMN-Konzentration beobachtet wurde.

4.4 Durch die Substratbindung induzierte Konformationsänderung

Anhand der Oberflächendarstellung der PfNaMNAT aus Abb. 3.29 S. 102 kann man erkennen, dass das Produkt größtenteils von dem Enzym eingeschlossen wird. Dies gilt insbesondere für die Adeninbase. Selbst mit einem entsprechenden Circe-Effekt dürfte es nur schwierig umsetzbar sein, die einzelnen Substrate in dieser Konformation in das aktive Zentrum zu dirigieren. Gänzlich illusorisch erweist sich dies für die in Abb. 3.29 und 3.30 S. 102f dargestellten bakteriellen NaMNATs. Hier ist das Produkt gänzlich von dem jeweiligen Enzym eingeschlossen, es verbleiben nur minimalste Öffnungen. Eine Substrataufnahme ist in diesen Konformationen gänzlich ausgeschlossen. Es lässt sich somit deduzieren, dass zumindest bei den gezeigten bakteriellen NaMNATs eine Konformationsänderung erfolgen muss, um das Substrat aufzunehmen. Für die PfNaMNAT erscheint dies ebenfalls angebracht.

Da bislang keine Apo-Struktur der PfNaMNAT zur Verfügung steht (vergleiche hierzu auch die Erörterung in Abschnitt 4.1 S. 122) kann zunächst noch keine Aussage zu einer möglichen Konformationsänderung des Enzyms erfolgen. Jedoch ist eine hohe Kongruenz der Tertiärstrukturen der NaMNAT einiger Bakterien (z.B. *S. aureus* und *B. anthracis*) mit der PfNaMNAT gegeben (siehe Abschnitt 3.2.3.3 S. 91ff). Daher soll hier eine Herleitung einer möglichen Konformationsänderung anhand dieser Strukturen erfolgen. Es sei jedoch noch einmal angemerkt, dass diese bei der PfNaMNAT bislang noch nicht direkt beobachtet werden konnte.

Lu *et al.* führten bereits einen Strukturvergleich der zwei Apo-BaNaMNAT-Strukturen mit der BsNaMNAT als Apo-Struktur und NaAD-Komplex durch [119]. Hierbei identifizierten die Autoren drei Regionen, welche eine große konformationelle Heterogenität nicht nur zwischen verschiedenen Apo-Strukturen aufweisen, sondern auch ihre Position in Folge der Substratbindung verändern. Bei der BaNaMNAT sind dies die Aminosäuren 40 – 53, 104 – 124 sowie 132 – 143. Auch der *E. coli* NaMNAT wurde ein hohes Maß an Flexibilität innerhalb dieser Bereiche zugeschrieben, je nachdem ob ein Ligand gebunden ist oder nicht [132][119]. Eine noch ausführlichere Untersuchung der BaNaMNAT durch Sershon *et al.* zeigte ebenfalls signifikante Konformationsänderungen auf, die zwischen Apo- und NaAD-haltiger Struktur vorliegen [123]. Es liegt somit ein *induced fit* vor.

Da die Verhältnisse entsprechend ausführlich an der BaNaMNAT untersucht wurden, soll diese die Basis für einen Vergleich mit der PfNaMNAT bilden. In Abb. 4.5 (A) wurde eine NaAD-haltige Struktur der BaNaMNAT mit zweier ihrer Apo-Strukturen überlagert. Die drei bereits angesprochenen Bereiche, welche eine hohe konformationelle Heterogenität aufweisen, können anhand der Überlagerung sehr leicht identifiziert werden. Bereich 1 entspricht den Aminosäuren 132 – 143 der BaNaMNAT. Bereich 2, ist den Aminosäuren 104 – 124 analog. Bereich 3 umfasst

schließlich die Aminosäuren 40 – 53, er entspricht dem PPHK-Loop. Anhand der drei Strukturen lässt sich der Übergang von einer offenen zu einer geschlossenen Konformation nachvollziehen. Das Produkt wird dabei wie von einer Hand ergriffen. Die Helix $\alpha 5$ entspricht in diesem Beispiel den Fingern und der PPHK-Loop dem Daumen einer rechten Hand.

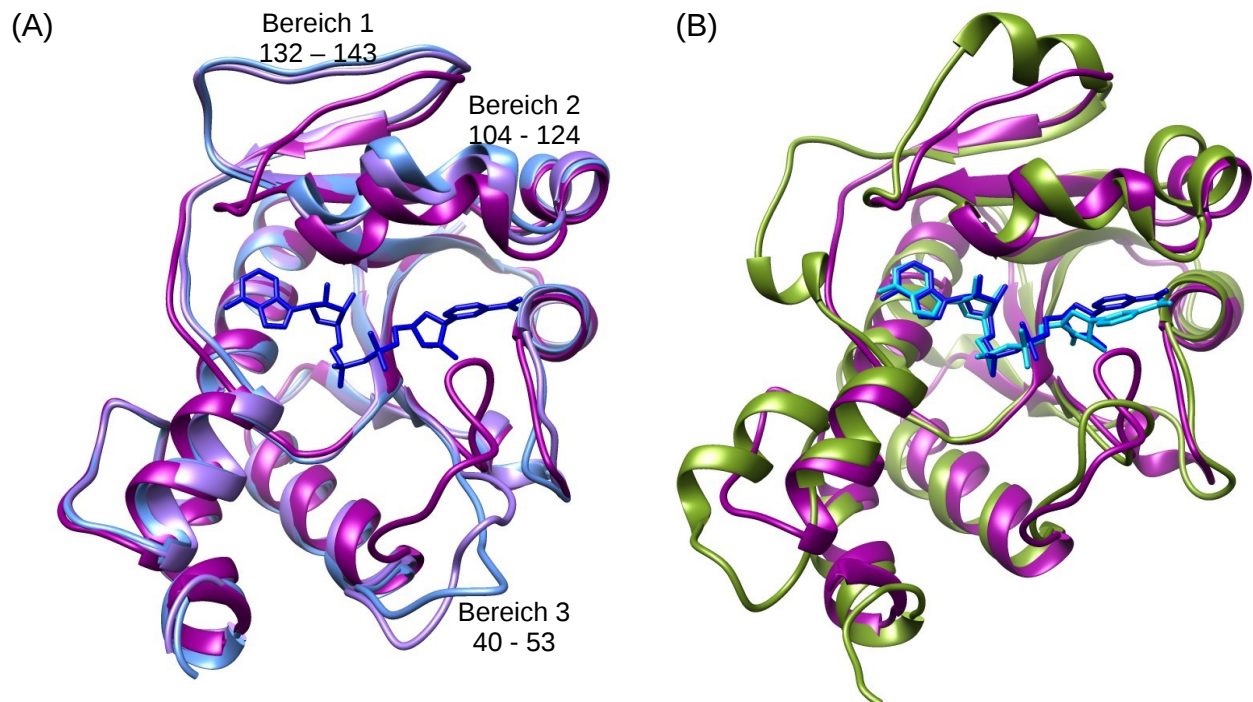


Abb. 4.5: Konformationsänderung infolge der Produktbindung.

In (A) sind drei Strukturen der BaNaMNAT überlagert. Eine dieser Strukturen stellt die geschlossene Konformation dar (2QTR in magenta). Die anderen beiden Strukturen zeigen verschiedene Varianten der offenen Konformation (2QTM, A-Kette hellblau, B-Kette lila). Drei Bereiche weisen eine besonders hohe Variabilität auf. (B) ist eine Gegenüberstellung der geschlossenen Konformationen der BaNaMNAT (magenta, NaAD in dunkelblau) und der PfNaMNAT (grün, NaAD in hellblau). Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt.

Die Überlagerung der Holo-Strukturen der PfNaMNAT und BaNaMNAT (Abb. 4.5 (B)) verdeutlicht, dass beide Enzyme eine ähnliche Konformation aufweisen, sofern das Produkt gebunden ist. Auch hier lassen sich drei äquivalente Bereiche identifizieren, welche vermutlich eine hohe Flexibilität aufweisen, es sind dies die Aminosäuren 42 – 52 (Bereich 3), 110 – 119 (Bereich 2, entspricht $\alpha 5$) und 135 – 149 (Bereich 1). Dass der Loop um Bereich 3 auch bei der PfNaMNAT eine hohe Flexibilität aufweist, kann bereits anhand der beiden gegebenen Strukturen der PfNaMNAT geschlossen werden. In der NaAD-haltigen Struktur finden sich hier sehr hohe B-Faktoren (siehe Abb. 3.28 und 3.29). In der APC-haltigen Struktur ist dieser Loop derart beweglich, dass keine hinreichende Elektronendichte für seine Darstellung gegeben ist.

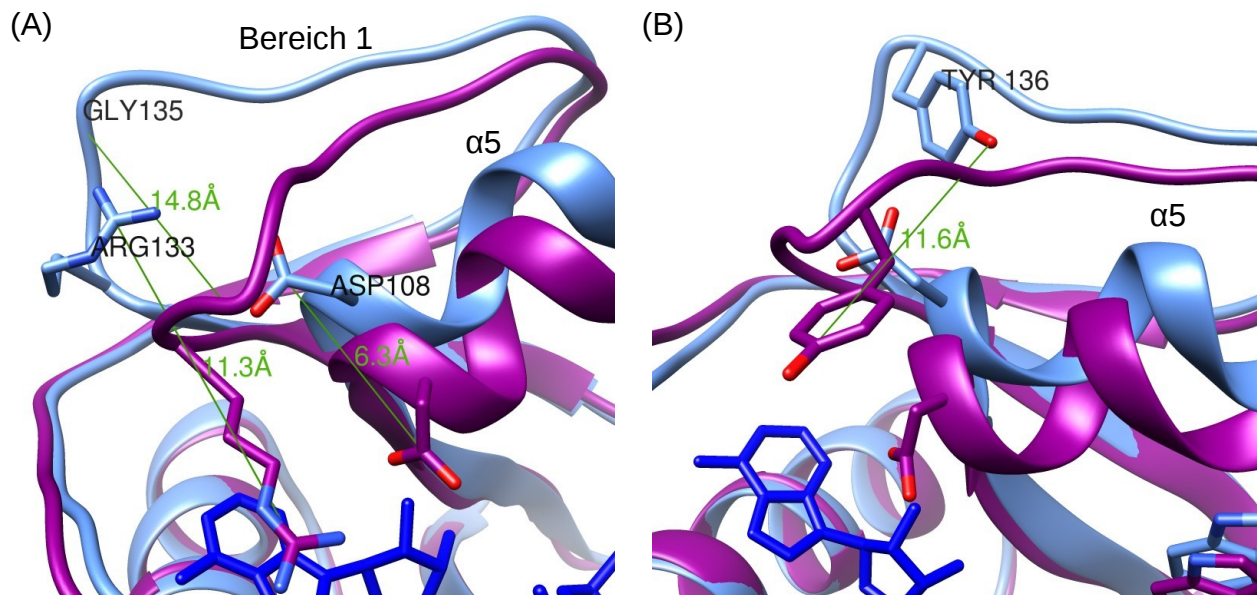


Abb. 4.6: Distanzvergleich der Apo- und Holo-BaNaMNAT-Strukturen.

Eine genaue Betrachtung des Bereichs 1 sowie von Helix $\alpha 5$ offenbart drastische Konformationsänderungen zwischen der Apo- und Holo-Struktur der BaNaMNAT. So bewegt sich das Rückgrat von Gly135 um ca. 15 Å (Messung von $\text{C}\alpha$ -Atom zu $\text{C}\alpha$ -Atom). Auch bei anderen Aminosäuren ist eine vergleichbare Beweglichkeit gegeben. (A) fokussiert auf die Aminosäuren Gly135, Arg133 und Asp108, (B) auf Tyr136 und dessen Interaktion mit Asp108. Der Farbcode wurde aus der vorausgehenden Abbildung übernommen.

Nach dieser übergeordneten Betrachtung der Konformationsänderungen des Gesamtzyms, soll nun eine fokussierte Untersuchung einzelner Bereiche sowie katalytisch relevanter Aminosäuren erfolgen (siehe Abb. 4.6). Bereiche 1 und 2 schließen voraussichtlich in Folge der ATP-Bindung. Gerade innerhalb des Bereichs 1 fallen dabei für einen derartig kleinen Strukturabschnitt drastische Distanzvarianzen zwischen Apo- und Holo-Struktur der BaNaMNAT auf. Das $\text{C}\alpha$ -Atom von Gly135 bewegt sich um nahezu 15 Å. Die Guanidiniumgruppe von Arg133 verschiebt sich um ca. 11 Å und verschließt dadurch das aktive Zentrum über der Adeninbase. Somit ist ersichtlich, dass hier ohne Bindung der Substrate respektive des Produkts eine große Öffnung besteht. Die Hydroxylgruppe von Try136 bewegt sich über ca. 12 Å. Dagegen erscheint die Verschiebung des Rückgrates von Helix $\alpha 5$ weitaus weniger dramatisch. Trotzdem ergeben sich auch hier elementare Veränderungen. Die Carboxylgruppe von Asp108 bewegt sich um ca. 6 Å. Dadurch gelangt sie in der Holo-Struktur erst in das aktive Zentrum, wo sie für eine essentielle Interaktion mit der Ribose des ATP verantwortlich ist. Interessant ist dabei auch, dass durch die Umlagerung des Bereichs 1 Tyr136 eine Position einnimmt, die zu einer sterischen Kollision mit Asp108 der Apo-Struktur führt. Für Asp108 bleibt somit nur noch eine Rotamerkonformation, die in das aktive Zentrum hineinragt. Auch bei der PfNaMNAT tritt eine homologe Aminosäure auf: Es ist Asp111 (siehe Abb. 3.26 S. 97 und Abb. 3.27 S. 99). Für die PfNaMNAT wurde bereits zuvor gezeigt, dass Asp111 für die Katalyse unabdingbar ist. O'Hara *et al.* wiesen nach, dass der Austausch dieses Asparagins gegen ein Alanin einen Funktionsverlust

des Enzyms nach sich zieht [64]. Insgesamt erweist sich die übergeordnete Struktur der PfNaMNAT in diesem Bereich als sehr ähnlich zur BaNaMNAT. Die Funktion von Tyr136 wird dabei von Phe139 übernommen (siehe Abb. 4.7). Interessant ist bei der PfNaMNAT auch die Helix $\alpha 7$, die zu dem Bereich 1 zählt. Sollte sich diese Helix in der Apo-Struktur der PfNaMNAT gar partiell entwinden, so wären sogar noch größere Konformationsänderungen denkbar, als dies bei der BaNaMNAT der Fall ist.

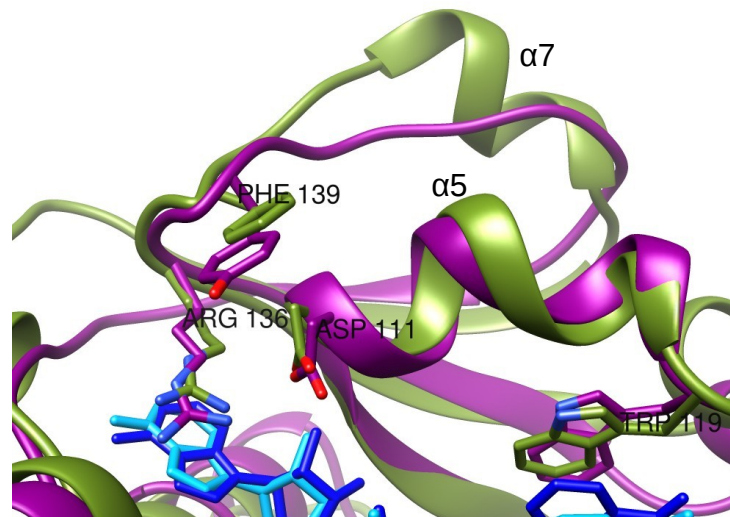


Abb. 4.7: Vergleich der PfNaMNAT und BaNaMNAT Holo-Strukturen.

PfNaMNAT und BaNaMNAT weisen eine sehr ähnliche Architektur auf. Für die Katalyse relevante Aminosäuren sind mit ihren jeweiligen Entsprechungen in beiden Strukturen hervorgehoben. Die Beschriftungen dieser Aminosäuren ist nur für die PfNaMNAT angegeben. Ein Vergleich ist jedoch mit der vorausgehenden Abbildung der BaNaMNAT möglich. Der Farbcode wurde aus den beiden vorausgehenden Abbildungen übernommen (PfNaMNAT grün, BaNaMNAT magenta).

Lu *et al.* führen aus, dass „konformationelle Diversität eine intrinsische Eigenschaft der drei betrachteten Bereiche“ wäre [119]. Für den PPHK-Loop scheint dies in der Tat erfüllt zu sein. Betrachtet man etwa neben der 2QTM Struktur (siehe Abb. 4.5) auch noch die Struktur 3DV2, beides Apo-Strukturen der BaNaMNAT, so ergeben sich noch weitere Konformationsvarianten für diesen Loop (Daten nicht gezeigt). Allerdings vergleichen die Autoren hier Apo- und Holo-Strukturen miteinander. Vergleicht man gesondert nur die jeweiligen Apo- oder Holo-Strukturen, so fällt auf, dass deren Konformationen für sich genommen erstaunlich gut miteinander übereinstimmen. Dies gilt zumindest für die Bereiche 1 und 2. Letztlich liegt jedoch der sprichwörtliche Vergleich von Äpfeln mit Birnen vor. Die angesprochene konformationelle Diversität liegt viel mehr in der Konformationsänderung infolge der Substratbindung begründet und ist somit weniger eine intrinsische Eigenschaft dieser Bereiche. Es ist durchaus denkbar, dass diese Bereiche in der Apo-Konformation relativ rigide sind. Aus einer thermodynamischen Betrachtung würde in diesem Fall erst durch die vielfache Interaktion mit dem Substrat

respektive Produkt, die nötige Energie bereitgestellt werden, welche benötigt wird, um die Bereiche 1 und 2 auf das aktive Zentrum zuzubewegen. Das Substrat überbrückt *quasi* den leeren Raum der Substratbindetasche und zieht beide Seiten aufeinander zu. Dabei liefert es die Energie, die nötig ist, damit das Enzym seine vollständig geschlossene Konformation einnehmen kann. Das Substrat liefert sozusagen die Energie für die Konformationsänderung eines *induced fit*. Die exakte Einpassung des Substrates wäre somit Prämisse für die Konformationsänderung des Enzyms, da nur ein passendes Substrat durch seine Interaktionen die nötige Energie bereitstellt. Die Konformationsänderung würde somit zur Grundlage der Substraterkennung. Es wären weitere Untersuchungen der Rigidität der Apo-Konformation nötig, um diese Theses weiter abzusichern.

Eine durch die Substratbindung induzierte Konformationsänderung der PfNaMNAT ist ausgehend von der Homologie mit bakteriellen NaMNATs sowie der eng geschlossenen Struktur der Holo-Struktur wahrscheinlich. Nichtsdestotrotz wäre es wünschenswert, dies auch experimentell zu verifizieren. Die Kristallisation der Apo-Struktur wäre sicherlich am ehesten geeignet, den Sachverhalt aufzuklären. Dies könnte sich, ausgehend von den Überlegungen aus Abschnitt 4.1 (siehe S. 122), als schwierig erweisen. Eine Klasse von Enzymen, deren Funktion integral mit einer großen Konformationsänderung verknüpft ist, sind Kanalproteine. Bei ihnen handelt es sich um Transmembranproteine, deren Kristallisation schwierig ist, auch wenn hier Fortschritte erzielt werden konnten [159]. Daher haben sich hier positionsspezifische Fluoreszenzmessungen als probates Mittel erwiesen, um einen Einblick in die Struktur und Bewegungsmechanismen zu erhalten [160][161][162]. Dies hat sogar eine Echtzeitbeobachtung von Konformationsänderungen ermöglicht [161]. Der klassische Ansatz für solche Distanzmessungen besteht in der Observation eines Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) zwischen zwei Fluoreszenzsonden. Die FRET-Messungen sind dabei für Distanzen zwischen 30 – 70 Å nutzbar [163][162]. Diese Distanzen wären allerdings grenzwertig, um eine Messung bei der PfNaMNAT durchführen zu können. Eine andere Möglichkeit bieten Biman Fluoreszenzsonden, die in verschiedenen Varianten erhältlich sind und leicht an Thiolgruppen gekoppelt werden können [164]. Bei diesen Fluoreszenzmarkierungen macht man sich den *quenching*-Effekt mit benachbarten Tryptophanresten zunutze. Hierbei ist eine Distanzbestimmung für entfernte (>15 Å), nahe ($\sim 10 - 15$ Å) und sehr nahe ($5 - 10$ Å) Bereiche möglich [163]. Im Fall von LacY waren auch noch Distanzänderungen der C α -Atome zweier Aminosäuren von 32 auf 20 Å nutzbar (eigene Messung anhand von 2CFQ und 4OAA) [161]. Ein Vorteil von Biman-Sonden bestünde auch darin, dass keine Interferenz mit den Substraten ATP und NaMN respektive NMN oder den Produkten NaAD und NAD zu befürchten wäre. Denn Biman absorbiert im Bereich von ca. 380 – 390 nm und fluoresziert bei ca. 480 – 490 nm [163]. Räumliche Nähe von Tryptophan resultiert schließlich in Fluoreszenzlöschung [160][162].

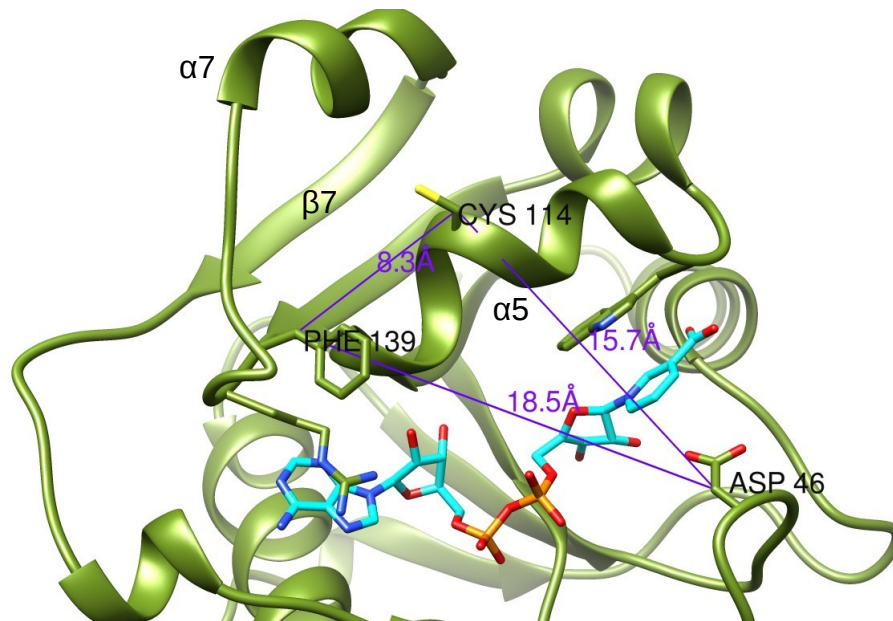


Abb. 4.8: Positionen und Distanzen für potentielle Biman-Markierungen der PfNaMNAT.

Die PfNaMNAT weist bereits ein natürliches Cystein auf der helikalen Struktur $\alpha 5$ auf. Dies könnte evtl. für die Kopplung eines Bimans genutzt werden. Weitere Aminosäuren, welche in einer Mutagenese gegen Tryptophan ausgetauscht werden könnten, sind namentlich beschriftet. Die Distanzmessung erfolgt an den C β -Atomen der jeweiligen Aminosäuren. Durch die Ausdehnung der Biman-Moleküle selbst könnten die letztlichen Abstände noch weiter sinken. Alternativ könnte eine Markierung auch an dem Strang $\beta 7$ und Phe139 erfolgen. Bei Substratbindung müsste die Fluoreszenz dann zunehmen.

Die Eigenschaften von Biman-Fluorophoren erscheinen daher als ideal um eine Untersuchung von mit der Substratbindung einhergehenden Konformationsänderungen der PfNaMNAT zu untersuchen. Einige Abstände in der geschlossenen Konformation des Enzyms sind in Abb. 4.8 vermessen. Ein in der PfNaMNAT endogen vorhandenes Cystein auf $\alpha 5$ könnte dabei als natürlicher Kopplungspartner eines Bimans dienen. Es müsste nur noch ein Tryptophan eingefügt werden. Zwei potentielle Aminosäuren, Phe139 und Asp46, die sich für einen Austausch eignen, wurden bereits vermessen. Die Mutation F139W lässt dabei keine Komplikationen vermuten, da das Tryptophan die Funktion des Phenylalanin potentiell übernehmen kann. Ein anderes Problem könnte jedoch darin bestehen, dass mit Trp119 bereits am C-terminalen Ende von $\alpha 5$ ein Tryptophan vorhanden ist. Sollte die Helix selbst hier keine hinreichende Abschirmung gewährleisten, könnte es bereits zu einem unerwünschten permanenten *quenching*-Effekt kommen. Letztlich bleibt festzuhalten, dass die Wahl der zu modifizierenden Aminosäuren einer gewissen Sorgfalt bedarf und durch entsprechende Kontrollen negative Effekte ausgeschlossen werden müssten. Trotzdem wären hiermit ideale Voraussetzungen gegeben, um sogar eine Echtzeitbeobachtung der Konformationsänderung der PfNaMNAT durchzuführen. Über ein solches Experimente könnte zudem auf die Rigidität der Apo-Struktur geschlossen werden. Es könnte somit nicht nur die Konformationsänderung in Folge der Substratbindung beobachtet werden, sondern auch der zuvor diskutierte

thermodynamische Energiegewinn für die Konformationsänderung überprüft werden. Ohne NaAD bzw. NAD müsste die PfNaMNAT dann in der offenen Konformation fixiert sein.

4.5 Mögliche Regulation der PfNaMNAT

Wie bereits in Abschnitt 4.2 (S. 126ff) ausgeführt wurde, ist von einer kompetitiven Hemmung durch die Endprodukte NaAD und NAD auszugehen. An dieser Stelle soll jedoch noch ein weiterer Aspekt aufgegriffen werden, es ist dies die mögliche Regulation durch posttranslationale Modifikation (PTM) von Cysteinen. Cysteine weisen eine Sulfhydrylgruppe, auch Thiolgruppe genannt, auf. Dies verkörpert den höchst reduzierten Zustand von Schwefel, welcher in Proteinen auftritt. Die PTM dieser Gruppe durch Oxidation oder Alkylierung kann die katalytischen Eigenschaften eines Enzyms entscheidend beeinflussen. Man spricht von einem Thiol-switch [165]. Die PfNaMNAT weist insgesamt vier Cysteine auf (siehe Abb. 4.9). Für ein eher kleines Protein wie die PfNaMNAT ist dies besonders auffällig, denn Cystein zählt zu den seltensten Aminosäuren, oftmals ist sie sogar die seltenste. Trotzdem findet man sie häufig an funktional bedeutungsvollen Positionen. Dabei kann man folgende Kategorien unterscheiden: (I) strukturelle Cysteine (z.B. stabile Disulfidbrücken), (II) Metall-koordinierende Cysteine, (III) katalytische Cysteine und (IV) Cysteine, die als Punkte einer PTM dienen, sog. regulative Cysteine [166]. Welche dieser Funktionen ist nun für die einzelnen Cysteine am wahrscheinlichsten? Cys7 zählt zu dem Strang $\beta 1$ und befindet sich innerhalb des Proteins. Hier ist keine Evidenz für eine der obigen vier Funktionen gegeben. Anders verhält es sich dagegen mit Cys41 und Cys43 (siehe auch Abb. 3.27 S. 99 und 3.28 S. 100). Insbesondere Cys41 ist für die Katalyse relevant, in dem es die Ribose von NaMN oder NMN über Wasserstoffbrücken bindet. Dies wird auch durch die kinetische Charakterisierung der Mutante C41A verifiziert. Ihr K_M -Wert ist gegenüber dem Wildtyp drastisch erhöht (siehe Tab. 6 S. 109). Die Funktion von Cys43 ist dagegen weniger offensichtlich. Aus den gegebenen Strukturen lässt sich keine direkte Interaktion mit dem Substrat ableiten. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass ein Disulfid zwischen Cys41 und Cys43 gebildet werden könnte. Da es sich hier um den Bereich 3 handelt, der im Verlauf der Katalyse eine größere Konformationsänderung erfährt, wäre es auch denkbar, dass eine kovalente Modifikation an Cys43 erfolgt, um so die Beweglichkeit dieses Loops einzuschränken und z.B. in einer offenen Konformation zu fixieren. Eine weiterführende Diskussion der Bedeutung dieser beiden Cysteine soll noch im nachfolgenden Abschnitt erfolgen.

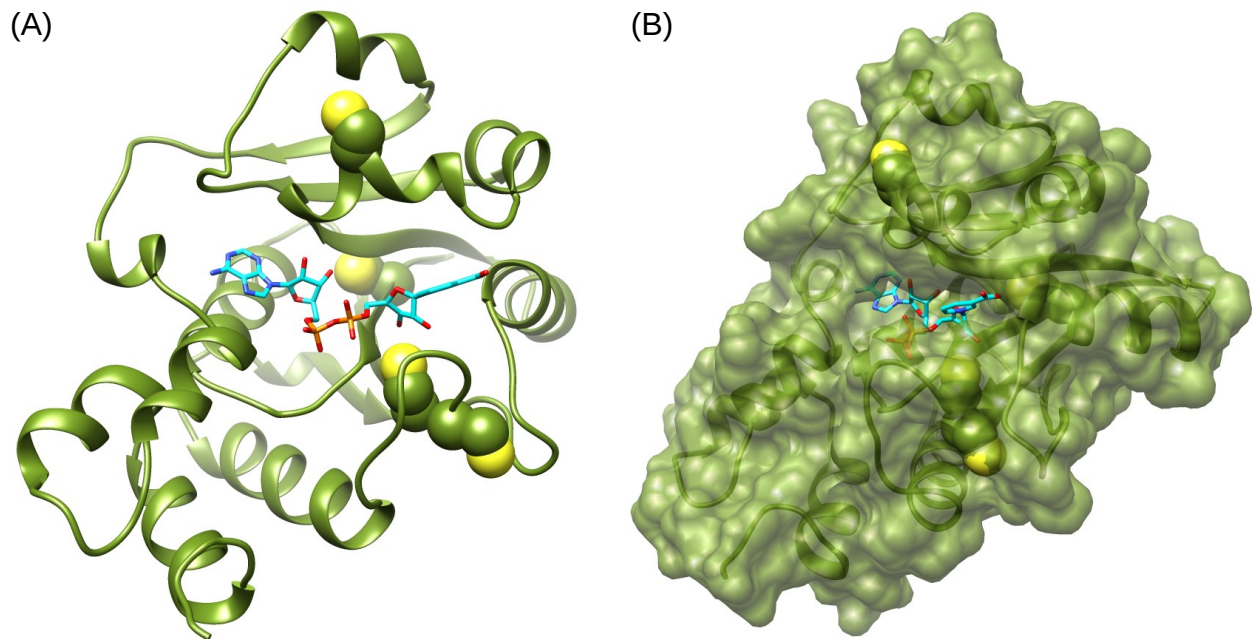


Abb. 4.9: Die vier Cysteine der PfNaMNAT.

Anhand der Struktur kann versucht werden, auf eine Funktion der vier Cysteine der PfNaMNAT zu schließen. Cys7 befindet sich im Inneren des Proteins auf Strang $\beta 1$. Anders verhält es sich dagegen mit den drei verbleibenden Cysteinen. Cys41 befindet sich im aktiven Zentrum und interagiert direkt mit der Ribose. Cys43 sowie Cys114 sind oberflächlich exponiert (B). Hier sind sie für Modifikationen zugänglich. Cys43 ist Teil des Loops, welcher die Substratbindetasche verschließt und Cys114 befindet sich auf $\alpha 5$.

Hier soll das letzte verbliebene Cystein, Cys114, näher betrachtet werden. Seine Position direkt oben auf der helikalen Struktur $\alpha 5$, in deren Mitte, ist zu auffällig, um zufällig zu sein. An der Katalyse kann es nicht direkt beteiligt sein, ebenso wenig kann es ein intramolekulares Disulfid ausbilden. Verbleibt die Möglichkeit einer PTM. Es ist bekannt, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) mit hoch reaktiven Cysteinen reagieren können und als *second messenger* fungieren [167]. Aber auch das Radikal Stickstoffmonoxid (NO) kann durch S-Nitrosylierung zur Grundlage einer PTM werden [168]. Eine weitere Modifikation kann durch die reversible Addition eines Glutathions (GSH) im Verlauf einer S-Glutathionylierung erfolgen [169]. Ob eine, und wenn ja welche, der genannten PTMs an der PfNaMNAT erfolgt, kann noch nicht bestimmt werden. Eine Hemmung der PfNaMNAT unter oxidativem Stress erscheint jedoch kontraproduktiv, denn gerade in dieser Situation werden Reduktionsäquivalente in Form von NADH respektive NADPH benötigt [51].

An dieser Stelle sei ein mögliches Experiment zu einer Untersuchung der Auswirkungen einer PTM an einem Cystein vorgeschlagen. Hierzu sollte eine *in vitro* Modifikation des Cysteins erfolgen. Geeignet hierfür erscheint N-Ethylmaleimid (NEM). Hierbei handelt es sich um eine relativ kleine Verbindung, welche stabile, kovalente Thioetherbindungen mit Sulfhydrylgruppen aufbaut. Um die beschriebene Theorie zu verifizieren, dürfte PfNaMNAT, die so modifiziert

wurde keine Aktivität mehr aufweisen. Eine solche *in vitro* Modifikation mit NEM sollte an Cys43 sowie Cys114 machbar sein um zu überprüfen, ob hier eine Regulation durch eine kovalente Modifikation möglich wäre.

4.6 Die Bedeutung der Cysteine 41 und 43

In den vorausgehenden Abschnitten wurden die Cysteine Cys41 und Cys43 bereits mehrfach aufgegriffen. Hier soll nun noch einmal eine fokussierte Betrachtung dieser beiden Aminosäuren, auch im Kontext der kinetischen Charakterisierung ihrer Mutanten erfolgen, um ihre Signifikanz näher beurteilen zu können.

Beide Aminosäuren befinden sich innerhalb der Region, die dem flexibelsten Abschnitt des Bereichs 3 vorausgeht. Die hohe Flexibilität der nachfolgenden Aminosäuren manifestiert sich auch darin, dass Cys43 die letzte Aminosäure ist, welche noch in der APC-haltigen Struktur ansatzweise zu erkennen ist (siehe Abb. 3.28 (B) Seite 100) sowie in den hohen B-Faktoren der nachfolgenden Aminosäuren der NaAD-haltigen Struktur (siehe Abb. 3.28 (C)). Bei anderen NaMNATs würde sich das PPHK-Motiv an Cys43 anschließen. Mit ihrem Abstand von nur einer intervenierenden Aminosäure (Arg42) wäre ihre jeweilige Position ideal, um eine Disulfidbrücke auszubilden. Indizien für eine derartige Konformation konnten jedoch in keiner der beiden Strukturen gefunden werden. Es kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass *in vivo* ein Disulfid entsteht, denn eine Kristallstruktur ist nur die Momentaufnahme einer einzelnen Konformation. Bei Betrachtung der Kristallstruktur ist schließlich auch zu berücksichtigen, dass die Kristallisation der PfNaMNAT stets mit dem Zusatz von TCEP erfolgte. Ein evtl. vorhandenes Disulfid würde somit aufgelöst werden. Eine Kristallisation ohne TCEP könnte sich jedoch als schwierig erweisen, da durchaus das Potential für intermolekulare Disulfidbrücken zwischen einzelnen Enzymmolekülen besteht. In jedem Fall wäre ein Disulfid jedoch mit drastischen Auswirkungen auf die Katalyse korreliert. Die Beweglichkeit des Bereichs 3 würde eingeschränkt und darüber hinaus könnte Cys41 nicht mehr mit der Ribose von NaMN interagieren. Die Nähe der beiden Cysteine kann jedoch auch nur zufällig sein. Die Funktion des Cys41 wird bei anderen NaMNATs meist durch ein Serin oder Asparagin übernommen (siehe das Alignment in Abb. 3.24 S. 94). Alle drei Aminosäuren binden jeweils die Hydroxylgruppe der Ribose direkt durch eine H-Brücke. Das Cystein könnte bei der PfNaMNAT hier evtl. einen idealen Kompromiss für die zu überbrückende Distanz darstellen, denn Asparagin könnte mit seinem zusätzlichen Cy-Atom etwas zu lang sein. Eine auf Serin basierende H-Brücke wäre jedoch vermutlich nicht lang genug. Die mittlere Länge von H-Brücken unter Beteiligung von Cystein ist dagegen größer und wird hier ideal genutzt [138][139]. Interessant wäre an dieser Stelle eine Mutante C41S oder auch C41N, um zu überprüfen ob eine dieser Aminosäuren,

welche bei anderen NaMNATs an dieser Position auftreten, die Aufgabe des Cysteins vollständig übernehmen könnte. Wie bereits im Abschnitt 4.5 S. 139ff angesprochen, könnte Cys43 eine regulatorische Funktion innewohnen, indem es kovalent modifiziert wird und somit die Beweglichkeit des angeschlossenen Bereichs 3 einschränkt.

Dass Cys41 eine katalytische Funktion übernimmt und Cys43 eine regulatorische aufweist wird auch mittels der durchgeführten kinetischen Untersuchungen an Wildtyp und Cystein-Mutanten untermauert (siehe Abschnitt 3.2.4.2 S. 107ff und insbesondere Tab. 6 S. 109). Da der K_M -Wert die Substratkonzentration angibt, bei der die Hälfte der aktiven Zentren besetzt ist, kann er als Maß für die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat angesehen werden [42]. Daher soll zunächst bei der Interpretation der Messwerte auf ihn zurückgegriffen werden. Der zugrundeliegende Referenzwert ist hierbei naturgemäß der K_M -Wert des Wildtyps. Das Entfernen von Cys41 ist mit einem drastischen Anstieg der jeweiligen K_M -Werte korreliert. Da dieses Cystein nicht direkt mit ATP interagiert, fallen die Änderungen für ATP moderat aus und bewegen sich teils nur im Rahmen eines möglichen Messfehlers. Absolut evident sind sie dagegen für NaMN und NMN. Da durch die Struktur eine direkte Interaktion mit diesen Substraten herleitbar ist, erscheint dies auch nur folgerichtig. Die katalytische Funktion von Cys41 lässt sich also in der kinetischen Charakterisierung verifizieren. Im Vergleich dazu sind die Auswirkungen einer Mutation C43A nur moderater Natur. Ganz im Gegenteil scheinen die Effekte auf die Katalyse sogar positiv zu sein, denn die K_M -Werte sinken für NaMN und NMN. Dies wird weiter bestätigt, wenn man sich die K_M -Werte von PfNaMNAT^{C41A,C43A} ansieht. Diese liegen zwischen denen der Mutanten PfNaMNAT^{C41A} und PfNaMNAT^{C43A}, d.h. die negativen Auswirkungen von C41A werden sogar wieder partiell kompensiert, wenn man Cys43 austauscht. Mögliche Erklärungen für dieses Faktum sind naturgemäß spekulativ, sollen jedoch nicht unterschlagen werden. So wäre eine Möglichkeit, dass Cys43 in gewissen Konformationen im Bestreben ein Disulfid zu bilden, auf Cys41 einwirkt und es somit aus seiner für die Katalyse optimalen Position herauszieht. Vielleicht wirkt es in anderen als der in der Kristallstruktur zu sehenden Konformationen auch direkt auf das Substrat ein und bewirkt eine Verschiebung aus seiner optimalen Position. Hier könnte evtl. eine Mutante C43S helfen, die Situation zu klären. Wäre hier der K_M -Wert mit der Mutante C43A vergleichbar, so würde dies ein Disulfid als Ursache ausschließen. Eine weitere Option wäre natürlich auch die Strukturbestimmung mittels NMR. Letztlich bleibt zu konstatieren, dass C43 hier höchstens eine regulative Funktion übernehmen kann.

Bei den bisherigen Überlegungen wurden die V_{max} -Werte nicht berücksichtigt. Der Wildtyp und PfNaMNAT^{C41A} weisen ähnliche Katalysegeschwindigkeiten auf. Höher sind die Werte von PfNaMNAT^{C43A} und erreichen ein Maximum bei PfNaMNAT^{C41A,C43A}. Bestätigt wurde dies auch durch den Aktivitätstest, wobei die einzelnen Enzyme ein identisches Verhalten an den Tag

legten (siehe Abb. 3.35 S. 111). Trotz der negativen Auswirkungen auf den K_M -Wert steigt die Aktivität also an. Diese Unterschiede müssen jedoch nicht der physiologischen Realität entsprechen und könnten den artifiziellen Bedingungen des Assays geschuldet sein. Im Verlauf von weiteren Messungen mit dem Wildtyp wurde noch einmal deutlich, dass dessen Aktivität sehr schnell abnimmt und das Enzym sensitiv auf die jeweiligen Pufferbedingungen reagiert. Unter den gegebenen Bedingungen hat das Entfernen von Cys43 jedoch positive Effekte. Der K_M -Wert für die Substrate wird minimiert und V_{max} ca. verzehnfacht. Es bleibt zu konstatieren, dass die V_{max} -Werte des Wildtyps *in vivo* höher ausfallen könnten, evtl. innerhalb des Rahmens von PfNaMNAT^{C43A} oder PfNaMNAT^{C41A,C43A}.

Interessant sind auch die Ergebnisse des Oxidationstests (siehe Abb. 3.36 S. 112). In jedem Fall war eine Reaktivierung des Enzyms durch TCEP möglich. Die Oxidation mit Wasserstoffperoxid sowie Diamid zeigen dabei ähnliche, jedoch nicht gänzlich identische Ergebnisse. Da Diamid wesentlich spezifischer für Cystein ist sollen die dabei erzielten Ergebnisse Grundlage der weiteren Betrachtung sein. Bei dem Wildtyp sowie PfNaMNAT^{C43A} sind gleiche Abnahmen der Aktivität aufgetreten. Die stärkste Resonanz ist bei PfNaMNAT^{C41A} zu verzeichnen, wogegen PfNaMNAT^{C41A,C43A} gänzlich oxidationsresistent ist. C43 wird somit am stärksten durch Oxidation beeinflusst, denn es ist das in der Mutante C41A verbliebene Cystein. Hier könnten z.B. intermolekulare Disulfidbrücken auftreten und der Bereich 3 somit nicht mehr korrekt schließen. Die negativen Effekte von C43 scheinen durch C41 bei dem WT partiell kompensiert zu werden. Entstände hier ein intramolekulares Disulfid, wären die Auswirkungen sicherlich weniger dramatisch, als diejenigen eines intermolekularen Disulfids. Dass PfNaMNAT^{C41A,C43A} unbeeinflusst bleibt, zeigt ganz klar, dass beide Cysteine oxidationssensitiv reagieren. Die abweichenden Oxidationseffekte bei Wasserstoffperoxid könnten auch durch andere Effektoren als die Cysteine begründet sein, wie z.B. Oxidation von Tyrosin oder Aspartat [142].

Die Funktion von Cys43 konnte bislang nicht sicher bestimmt werden. Eine sehr spekulative Theorie soll hier noch angesprochen werden. C41 ist für die Katalyse wichtig. Dies kann anhand der Struktur sowie der K_M -Werte der Kinetik als verifiziert gelten. C43 könnte hier einen protektiven Effekt aufweisen. Unter oxidativen Bedingungen könnte z.B. ein Schutz vor einer irreversiblen Überoxidation zur Sulfonsäure bestehen, wenn ein Disulfid gebildet wird. Außerdem könnte eine Oxidation von Cys41 auf Cys43 übertragen werden. Cys43 liegt im Gegensatz zu Cys41 an der Oberfläche des Proteins. Hier wäre evtl. eine weitere Übertragung von Elektronen auf ein Antioxidans wie GSH oder Trx möglich. Prämisse hierfür wäre natürlich eine Konformationsänderung von Cys43, das vom aktiven Zentrum zur Oberfläche hin rotieren müsste. Ein möglicher Assay hierzu wäre relativ leicht zu realisieren, es müssten der WT und PfNaMNAT^{C43A} unter oxidativem Stress kinetisch untersucht werden. Könnte ein großes Molekül wie Trx, welches nicht in das eigentliche aktive Zentrum vordringen kann, um dort direkt zu

wirken, eine protektive Wirkung entfalten, so wäre dies ein Beleg obiger Theorie. Die Wirkung dürfte jedoch nur bei dem Wildtyp und nicht bei der Mutante auftreten.

Als Quintessenz lässt sich festhalten, dass Cys41 eine belegbare katalytische Funktion aufweist. Weniger gut gesichert erscheint dagegen die Funktion von Cys43. Es könnte eine regulatorische Aufgabe besitzen, indem z.B. die externe Bindung eines GSH die Flexibilität des Loops herabsetzt. Darüber hinaus wäre aber auch eine protektive Funktion denkbar, die Cys41 vor Überoxidation schützt, indem ein Disulfid gebildet wird oder Elektronen von C41 an externe Antioxidantien übertragen werden.

4.7 Kinetischer Vergleich mit anderen NaMNATs

NaMNAT wurde bereits bei einer Vielzahl anderer Organismen kinetisch charakterisiert. Die Enzymdatenbank Brenda listet verschiedenste K_M -Werte für alle drei Substrate des Enzyms (EC 2.7.7.18) auf. Dabei werden teils verschiedene Synonyme für identische Substrate verwendet (Nicotinatribonukleotid sowie Nicotinsäuremononukleotid sind synonym, ebenso wie Nicotinamidmononukleotid und Nicotinamidribonukleotid). Eine Auswahl in der Originalliteratur überprüfter K_M -Werte ist in Tab. 9 angegeben.

Besonders interessant ist dabei sicherlich der Vergleich mit den von O'Hara *et al.* für die PfNaMNAT ermittelten Werten. Für NaMN wurde von diesen Autoren ein etwas höherer K_M -Wert ermittelt. Die Größenordnung ist jedoch identisch. Letztlich kann diese Abweichung auf experimentelle Unterschiede der verschiedenen Assaysysteme zurückgeführt werden. Auffällig ist dagegen jedoch der K_M -Wert für ATP, hier stehen 20 μM ca. 500 μM gegenüber. Da der hier durchgeführte Malachitgrün-Assay jedoch unabhängig von zwei Personen durchgeführt wurde und dabei ähnliche Werte erhalten wurden, scheint ein Messfehler wenig plausibel. Das von O'Hara *et al.* verwendete *PiPerTM Pyrophosphate Assay Kit* besteht aus vergleichsweise vielen Komponenten, bei denen Nebeneffekte nicht ausgeschlossen werden können. Ausgehend von den eigenen Beobachtungen beim Erstellen der K_M -Kurven sei zudem noch einmal darauf hingewiesen, dass ATP bereits selbst starke Hintergrundfärbungen hervorgerufen hat. Diese wurden in dem hier durchgeführten Assay jedoch berücksichtigt und kompensiert. Um wirklich Klarheit zu erhalten, verbliebe nur das simultante Messen beider Assays vorzugsweise mit den jeweiligen Originalexperimentatoren. Ein K_M -Wert von ca. 0,5 mM erscheint jedoch physiologisch gerechtfertigt, denn die zelluläre ATP-Konzentration liegt im unteren millimolaren Bereich [170][171][172]. Es wird davon ausgegangen, dass der K_M -Wert bei vielen Enzymen die Substratkonzentration *in vivo* annähernd widerspiegelt [42]. Selbst mit 0,5 mM läge der K_M -Wert der PfNaMNAT immer noch unterhalb der zellulären ATP-Konzentration. Ausgehend von der Tatsache, dass Enzyme allgemein ein Funktionsoptimum und kein Funktionsmaximum

erreichen, erscheint der hier gemessene K_M -Wert durchaus plausibel. Die zelluläre Konzentration von NaMN respektive NMN dürfte dagegen wesentlich niedriger sein und den niedrigen K_M -Wert somit rechtfertigen. Zudem findet sich auch bei anderen ATP abhängigen Enzymen je nach Organismus eine große Bandbreite verschiedener K_M -Werte. Die bei BRENDA gelisteten K_M -Werte der Adenylatkinase (EC 2.7.4.3) liegen zwischen 1 mM und wenigen μ M, die der Guanylatkinase (2.7.4.8) zwischen 1 mM und 0,1 mM. Beide Enzyme weisen eine P-Schleife sowie Rossmann Falte auf [175].

Tab. 9: K_M -Werte orthologer NaMNATs.

Organismus	Substrat	K_M -Wert (μ M)	Bedingung	Quelle
<i>E. coli</i>	ATP	500	37 °C, pH 7,5	[173][158]
<i>B. anthracis</i>	ATP	44	pH 7,5	[119]
<i>B. subtilis</i>	ATP	135	37 °C, pH 7,4	[133]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATP	60	37 °C, pH 7,5	[158]
		104 (yNMNAT-1)	37 °C, pH 5 – 9	[174]
		1400 (yNMNAT-2)	37 °C, pH 5 – 9	[174]
<i>E. coli</i>	NaMN	30	37 °C, pH 7,5	[173]
		80	37 °C, pH 7,5	[158]
<i>B. subtilis</i>	NaMN	43	37 °C, pH 7,4	[133]
<i>S. cerevisiae</i>	NaMN	130	37 °C, pH 7,5	[158]
<i>B. anthracis</i>	NaMN	25	pH 7,5	[119]
<i>E. coli</i>	NMN	200	37 °C, pH 7,5	[158]
<i>B. subtilis</i>	NMN	2300	37 °C, pH 7,4	[133]
<i>S. cerevisiae</i>	NMN	170 (yNMNAT-1)	37 °C, pH 5 – 9	[174]
		130 (yNMNAT-2)	37 °C, pH 5 – 9	[174]
		400	37 °C, pH 7,5	[158]
<i>P. falciparum</i>	ATP	$19,96 \pm 6,7$	pH 7,5	[64]
<i>P. falciparum</i>	NaMN	$35,86 \pm 5,1$	pH 7,5	[64]
<i>P. falciparum</i>	ATP	525 ± 99	pH 7,8	eigene Messung
<i>P. falciparum</i>	NaMN	22 ± 11	pH 7,8	eigene Messung
<i>P. falciparum</i>	NMN	40 ± 14	pH 7,8	eigene Messung

5 Ausblick

Die Lösung der Kristallstruktur der PfNaMNAT hat zu einem beachtlichen Erkenntniszuwachs über das Enzym beigetragen. Es stellt sich jedoch als eine nahezu emergente Eigenschaft der Wissenschaft dar, dass jede beantwortete Frage zumindest eine neue Frage aufwirft. Letztlich steuern diese neuen Fragen jedoch den weiteren Weg. Derart stellt sich auch die Situation für die PfNaMNAT dar. So konnten mehrere Cysteine identifiziert werden, welche an funktional auffälligen Positionen lokalisiert sind. Für Cys41 konnte eine katalytische Funktion nachgewiesen werden. Die Aufgaben von Cys43 sowie Cys114 konnten dagegen noch nicht eindeutig bestimmt werden. Es gibt Indizien dafür, dass beiden Cysteinen eine regulative Funktion zukommt. Für Cys43 wäre auch eine protektive Funktion denkbar. Die kovalente Modifikation von Cys114 könnte verhindern, dass das Protein in seine katalytisch aktive geschlossene Konformation überwechselt. Diese höchst spannenden Fragen gilt es in weiteren Experimenten aufzuklären. Hierzu können zusätzliche Mutanten der PfNaMNAT erstellt werden, welche die einzelnen Cysteine modifizieren. Es sind auch gezielte Modifikationen einzelner Cysteine mit thiol-spezifischen Reagenzien denkbar. Die jeweiligen Auswirkungen gilt es dann anhand von kinetischen Untersuchungen genauer zu evaluieren. Als mindestens ebenso interessant dürfte sich auch die strukturelle Untersuchung derartig modifizierter Enzymvarianten erweisen. Hier wäre z.B. die Kristallisation des Proteins mit einem veränderten Cys114 denkbar, um dessen Einfluss auf die Konformation des Proteins gezielt darzustellen. Sollten sich die bisherigen Kristallisationsbedingungen hierauf nicht übertragen lassen, so wäre auch die Messung möglicher Konformationsänderungen mittels geeigneter Fluoreszenzsonden, wie z.B. Bimane in Kombination mit Tryptophan, denkbar. Diese könnte auch eine Echtzeitbeobachtung möglicher Konformationsänderungen während der Katalyse ermöglichen. Die Funktion von Cys43 könnte ebenfalls in weiteren Kinetiken, evtl. mit Zusatz eines antioxidativen Proteins wie Trx genauer untersucht werden. Die wichtigste verbleibende Frage dürfte jedoch sein, ob die PfNaMNAT ein potentes *drug target* zur Bekämpfung von Malaria darstellt.

Letztlich verbleibt natürlich noch die Lösung der Struktur von Plrx. Hier bleibt abzuwarten, ob sich eines der vorgeschlagenen Homologiemodelle als Suchmodell für molekularen Ersatz als geeignet erweist. Sollte dies nicht möglich sein, so müsste die Phase mittels isomorphem Ersatz oder MAD (*multiwavelength anomalous dispersion*) über SeMet bestimmt werden.

6 Zusammenfassung

Die Nicotinsäuremononukleotid-Adenylyltransferase (NaMNAT) ist ein Enzym mit einer für die NAD-Synthese essentiellen Funktion. In Erythrocyten, welche mit Malaria infiziert sind, wurden erhöhte NAD-Konzentrationen festgestellt. Daher sollte die NaMNAT von *Plasmodium falciparum* (PfNaMNAT) im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert werden. Das Fundament dieser Arbeit stellen die beiden neuen Kristallstrukturen der PfNaMNAT dar, die jeweils mit 2,2 Å aufgelöst sind. Die Lösung der Struktur erfolgte über molekularen Ersatz mittels eines Homologiemodells der PfNaMNAT. Bei den Strukturen handelt es sich um Cokristallisationen, einmal mit dem ATP-Analogon APC, einmal mit dem Produkt Nicotinsäureadenindinukleotid (NaAD). Beide Strukturen ermöglichen es, sämtliche relevanten Interaktionen zwischen den beiden Substraten ATP und Nicotinsäuremononukleotid (NaMN) mit dem Enzym aufzuklären. Hierauf aufbauend kann gefolgert werden, dass es sich bei dem Reaktionsmechanismus um eine zufällige sequenzielle Bi-Bi-Reaktion handelt. Auch wenn die Sequenz der PfNaMNAT vergleichsweise stark von orthologen Enzymen abweicht, so zeigt die Struktur doch einen hohen Konservierungsgrad. Dies gilt insbesondere für das aktive Zentrum, mit einem konservierten Arginin und Tryptophan. Ausgehend von den homologen Strukturen einiger Bakterien kann darauf geschlossen werden, dass die PfNaMNAT durch die Substratbindung von einer offenen in eine geschlossene Konformation überwechselt (*induced fit*). Im Weiteren wurden mehrere funktionell relevante Cysteine identifiziert. Cys41 sowie Cys43 wurden anhand von Mutanten kinetisch charakterisiert. Bei Cys43 und Cys114 kann auf eine regulative Funktion geschlossen werden, für Cys41 ist eine katalytische Funktion belegt. In einer kinetischen Charakterisierung wurde zudem gezeigt, dass die PfNaMNAT NaMN gegenüber von Nicotinamidmononukleotid (NMN) moderat präferiert. Die bislang vermutete Anionenbindetasche für die Carboxylgruppe scheint dagegen nicht haltbar. Von O'Hara *et al.* wurde der Preiss-Handler-Weg als Quelle für die NAD-Synthese in *P. falciparum* postuliert. Anhand der hier gewonnenen Erkenntnisse scheint die Nutzung von NMN eine Alternative zu diesem Stoffwechselwege zu ermöglichen.

Ein weiteres potentiell wirkstoffziel stellt die Glutationreduktase von *Plasmodium* dar (PfGR). Im Rahmen eines *in silico screening* war das Molekül MPDI 21618 als Inhibitor der PfGR identifiziert worden. Daher wurde hier der Versuch unternommen den Wirkmechanismus über eine Cokristallisation von PfGR und MPDI 21618 aufzuklären.

Darüber hinaus wurde erstmals ein für die Strukturaufklärung hinreichend streuungsfähiger Kristall von Plasmoredoxin (Plrx) erhalten. Auf dem Weg zur Bestimmung der Phaseninformation konnten hierbei erste Homologiemodelle erstellt werden, so dass es in Zukunft möglich sein wird, auch die Struktur dieses Proteins aufzuklären.

7 Summary

Nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase (NaMNAT) is an enzyme possessing an essential functionality within NAD synthesis. Within human erythrocytes, infected with malaria, elevated concentrations of NAD have been shown. Therefore NaMNAT of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* (PfNaMNAT) has been characterized within this thesis. The foundation of this work is build up by the two novel 2.2 Å crystal structures of PfNaMNAT. Both of these structures contain ligands, one the ATP-analogue APC, the other one the product nicotinic acid adenine dinucleotide (NaAD). Both structures are complementary additions to one another and allow for the complete revelation of the interactions between both substrates ATP and nicotinic acid mononucleotide (NaMN) with the enzyme. Based upon this, it can be concluded, that the reaction mechanism is most likely a random sequential Bi-Bi-reaction. Substrates are arranged by PfNaMNAT in a perfect orientation, so that they can form a new bonding. Although the sequence of PfNaMNAT is only distantly related to other ortholog enzymes, the structure stills shows a remarkable degree of conservation. This is especially fulfilled for the active site, containing a highly conserved arginine and tryptophane residue. Besides this, several conserved structural motives are to be found. Based upon the homologous structure of some bacteria it can be deduced, that PfNaMNAT changes from an open conformation into a closed one upon binding of the substrates, a so called induced fit. Besides several cysteine residues possessing functional relevance could be identified. Cys41 and Cys43 have been kinetically characterized *via* their mutants. Cys43 as well as Cys114 a regulatory function can be postulated. For Cys41 a catalytically relevant function has been proven. Within kinetic characterization of the wildtype enzyme it could be shown, that PfNaMNAT prefers NaMN over nicotinamide mononucleotide (NMN) slightly. An up to now assumed anion binding pocket for the carboxylic acid of NaMN does not seem to be sustainable. The Preiss-Handler pathway has been proven as source for NAD synthesis in *P. falciparum* by O'Hara *et al.*. Considering the newly acquired results of this work, the direct utilization of NMN seems to represent an alternative to this pathway.

Glutathione reductase of *P. falciparum* (PfGR) represents another attractive drug target. A virtual screening revealed the molecule MPDI 21618 as a potential inhibitor of PfGR. Within this study a cocrystallization of PfGR and MPDI 21618 was attempted to elucidate their interaction mode.

In addition protein crystals of *P. falciparum* plasmoredoxin (Plrx), a 22 kDa redox-active protein have been obtained. A whole data set suitable for structure determination has been obtained. On the way to determine phase information first homology models have been generated, so that it should be possible to elucidate the structure of this protein in the near term future.

8 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
A	Adenin oder Ampere
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destiliertes Wasser
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
DTG	Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin
DM	PfNaMNAT ^{C41A,C43A}
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSSP	<i>Dictionary of Protein Secondary Structure</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EID	<i>emergin infectious diseases</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
G	Guanin
GR	Glutathinreduktase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunde
H-Brücke	Wasserstoffbrücke

HDR	<i>high dynamic range</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRS	<i>indoor residual spraying</i>
ITN	<i>insecticide-treated nets</i>
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
Lsg.	Lösung
m	Meter
M	Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute
MMV	<i>Medicines for Malaria Venture</i>
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MPI	Max-Planck-Institut
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
NADK	NAD-Kinase
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
NADS	NAD-Synthetase
NaMN	Nicotinsäuremononukleotid
NaMNAT	Nicotinsäuremononukleotid-Adenylyltransferase
NamPRT	Nicotinamidphosphoribosyltransferase
NaPRT	Nicotinsäurephosphoribosyltransferase
NamRK	Nicotinamidribosidkinase
NEM	N-Ethylmaleimid
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NMN	β -Nicotinamidmononukleotid
NMNAT	Nicotinamidmononukleotid-Adenylyltransferase
NRK	Nicotinsäureribosidkinase
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i>

P _i	anorganisches (<i>inorganic</i>) Orthophosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
PPase	Pyrophosphatase
PP _i	anorganisches (<i>inorganic</i>) Pyrophosphat
PEG	Polyethylenglycol
Plrx	Plasmoredoxin
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
PTM	posttranslationale Modifikation
Qa	Chinolinsäure
QaPRT	Chinolinsäurephosphoribosyltransferase
RBM	<i>Roll Back Malaria</i>
RBS	ribosomale Bindungsstelle
rMMS	<i>random microseed matrix screening</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SeMet	Selenomethionin
SLS	<i>Swiss Light Source</i>
Stdabw.	Standardabweichung
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAD	Tiazofurinadenindinukleotid
TB	<i>terrific broth</i>
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris(2-chlorethyl)phosphat
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMN	Tiazofurinmononukleotid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UNDP	<i>United Nations Development Programme</i>
UNICEF	<i>United Nations International Children's Emergency Fund</i>
V	Volt
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp

Literaturverzeichnis

1. Berche P (2012) Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. *Clin Microbiol Infect* 18:1-6.
2. Stapleton DH (2004) Lessons of history? Anti-malaria strategies of the International Health Board and the Rockefeller Foundation from the 1920s to the era of DDT. *Public Health Rep* 119:206-15.
3. Russel PF (1955) Man's Mastery of Malaria. 1te Auflage. *Oxford University Press*.
4. Cockburn TA (1963) The Evolution and Eradication of Infectious Diseases. 1te Auflage. *The Johns Hopkins University Press*, Baltimore.
5. Hinman EH (1966) World Eradication of Infectious Diseases. 1te Auflage. *Charles C. Thomas*, Springfield.
6. Snowden FM (2008) Emerging and reemerging diseases: a historical perspective. *Immunol Rev* 225:9-26.
7. Institute of Medicine (US) Committee on Emerging Microbial Threats to Health; Lederberg J, Shope RE, Oaks SC, Hrsg. (1992) Emerging Infections: Microbial threats to health in the United States. 1te Auflage. *National Academies Press*, Washington.
8. Morens DM, Fauci AS (2012) Emerging infectious diseases in 2012: 20 years after the institute of medicine report. *mBio* 3: e00494-12.
9. Enserink M (2013) SARS: Chronology of the epidemic. *Science* 339:1266-71.
10. Shi Z, Hu Z (2008) A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus. *Virus Res.* 133:74-87.
11. Snowden FM (2009) The global crisis of malaria: Report on a Yale conference. *Yale J Biol Med.* 82:19-23.
12. EDEN Project www.eden-fp6project.net – aufgerufen 14.10.2014
13. EDEN Project (2004) Annex I - Description of Work.
14. Robert Koch-Institut, Hrsg. (2011) Steckbrief seltener und importierter Infektionskrankheiten.
15. WHO (2013) World Malaria Report 2013.
16. Feachem RG, Phillips AA, Hwang J, Cotter C, Wielgosz B, Greenwood BM, Sabot O, Rodriguez MH, Abeyasinghe RR, Ghebreyesus TA, Snow RW (2010) Shrinking the malaria map: progress and prospects. *Lancet* 376:1566-1578.
17. Wernsdorfer WH, Hay SI, Shanks GD (2009) Kapitel 6: Learning from history. Aus: Shrinking the malaria map: A prospectus on malaria elimination. 1te Auflage. *The Global Health Group*, UCSF Global Health Sciences, San Francisco.
18. WHO (2013) Malaria - Fact sheet N 94, reviewed March 2013. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html – aufgerufen 18.10.2014
19. Roll Back Malaria Partnership www.rbm.who.int/index.html – aufgerufen 18.10.14
20. Roll Back Malaria Partnership (2008) The global malaria action plan - For a malaria free world.
21. Ponçon N, Toty C, L'Ambert G, Le Goff G, Brengues C, Schaffner F, Fontenille D (2007) Biology and dynamics of potential malaria vectors in Southern France. *Malar J* 6:18.
22. Linard C, Ponçon N, Fontenille D, Lambin EF (2009) Risk of malaria reemergence in Southern France: Testing scenarios with a multiagent simulation model. *Ecohealth* 6:135-47.

23. Doudier B, Bogreau H, DeVries A, Ponçon N, Stauffer WM 3rd, Fontenille D, Rogier C, Parola P (2007) Possible autochthonous malaria from Marseille to Minneapolis. *Emerg Infect Dis* 13:1236-8.
24. Cuadros J, Calvente MJ, Benito A, Arévalo J, Calero MA, Segura J, Rubio JM (2002) *Plasmodium ovale* malaria acquired in central Spain. *Emerg Infect Dis* 8:1506-8.
25. Mehlhorn H (2012) Die Parasiten der Tiere. 7te Auflage. *Springer Spektrum*, Berlin, Heidelberg.
26. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T et al. (2012) A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors* 5:69.
27. Storch V und Welsch U (2009) Kükenthal - Zoologisches Praktikum. 26te Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
28. Pain A, Böhme U, Berry AE, Mungall K, Finn RD et al. (2008) The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature* 455:799-803.
29. Yakob L, Bonsall MB, Yan G (2010) Modelling knowlesi malaria transmission in humans: vector preference and host competence. *Malar J* 9:329.
30. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ (2004) A large focus of natural acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 363:1017-24.
31. Wehner R, Gehring W (2007) Zoologie. 24te Auflage. *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart, New York.
32. Kats LM, Cooke BM, Coppel RL, Black CG (2008) Protein trafficking to apical organelles of malaria parasites - building an invasion machine. *Traffic* 9:176-86.
33. Mehlhorn H (2012) Die Parasiten des Menschen. 7te Auflage. *Springer Spektrum*, Berlin, Heidelberg.
34. Chandelia S, Jain S, Dubey NK (2013) Congenital vivax malaria: rare or underdiagnosed infection. *Trop Doct* 43:161-3.
35. D'Alessandro U, Ubben D, Hamed K, Ceesay SJ, Okebe J, Taal M, Lama EK, Keita M, Koivogui L, Nahum A, Bojang K, Sonko AA, Lalya HF, Brabin B (2012) Malaria in infants aged less than six months - is it an area of unmet medical need? *Malar J* 11:400.
36. CDC (2014) www.cdc.gov/malaria/travelers/index.html – aufgerufen 18.10.14
37. CDC (2014) Travel Fact Sheets. www.cdc.gov/malaria/references_resources/fsp.html – aufgerufen: 18.10.2014
38. Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin (2014) Empfehlungen zur Prophylaxe und Therapie der Malaria der DTG 2014. <http://www.dtg.org/malaria.html> – aufgerufen: 18.10.14
39. Schlitzer M (2009) Medizinische Chemie der Wirkstoffe gegen Malaria. *Pharm Unserer Zeit* 38:512-20.
40. WHO (2010) Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010.
41. Spangenberg T, Burrows JN, Kowalczyk P, McDonald S, Wells TNC, Willis P (2013) The Open Access Malaria Box: A drug discovery catalyst for neglected diseases. *PLoS One* 8:e62906.
42. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2003) Biochemie. 5te Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
43. Voet D, Voet JG (2011) Biochemistry. 4te Auflage. *John Wiley & Sons*, Hoboken.
44. Höhn A, König J, Grune T (2013) Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *J Proteomics* 92:132-59.
45. Stark G (2005) Functional consequences of oxidative membrane damage. *J Membr Biol* 205:1-16.

46. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17:1195-214.
47. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 7:65-74.
48. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME (2013) Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev* 12:376-90.
49. Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23:197-223.
50. Ruwende C, Hill A (1998) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J Mol Med (Berl)* 76:581-8.
51. Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H (2004) Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol* 34:163-89.
52. Berger F, Ramírez-Hernández MH, Ziegler M (2004) The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem Sci* 29:111-8.
53. Preiss J, Handler P (1958) Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. I. Identification of intermediates. *J Biol Chem* 233:488-92.
54. Preiss J, Handler P (1958) Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. II. Enzymatic aspects. *J Biol Chem* 233:493-500.
55. Dölle C, Skoge RH, VanLinden MR, Ziegler M (2013) NAD diosynthesis in humans - enzymes, metabolites and therapeutic aspects. *Curr Top Med Chem* 13:2907-17.
56. Galassi L, Di Stefano M, Brunetti L, Orsomando G, Amici A, Ruggieri S, Magni G (2012) Characterization of human nicotinate phosphoribosyltransferase: Kinetic studies, structure prediction and functional analysis by site-directed mutagenesis. *Biochimie* 94:300-9.
57. Bieganowski P, Brenner C (2004) Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD in fungi and humans. *Cell* 117:495-502.
58. Berger F, Lau C, Dahlmann M, Ziegler M (2005) Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *J Biol Chem* 280:36334-41
59. Joshi JG, Handler P (1962) Purification and properties of nicotinamidase from *Torula cremoris*. *J Biol Chem* 237:929-35.
60. Zerez CR, Roth EF Jr, Schulman S, Tanaka KR (1990) Increased nicotinamide adenine dinucleotide content and synthesis in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood* 75:1705-10.
61. Olszewski KL, Morrissey JM, Wilinski D, Burns JM, Vaidya AB, Rabinowitz JD, Llinás M (2009) Host-parasite interactions revealed by *Plasmodium falciparum* metabolomics. *Cell Host Microbe* 5:191-9.
62. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, et al. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. (2002) *Nature* 419:498-511.
63. Kirk K, Martin RE, Bröer S, Howitt SM, Saliba KJ (2005) *Plasmodium* permeomics: membrane transport proteins in the malaria parasite. *Curr Top Microbiol Immunol* 295:325-56.
64. O'Hara JK, Kerwin LJ, Cobbold SA, Tai J, Bedell TA, Reider PJ, Llinás M (2014) Targeting NAD metabolism in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 9:e94061.
65. Zerez CR, Tanaka KR (1987) Impaired nicotinamide adenine dinucleotide synthesis in pyruvate kinase-deficient human erythrocytes: a mechanism for decreased total NAD

- content and a possible secondary cause of hemolysis. *Blood* 69:999-1005.
66. Lan SJ, Henderson LM (1967) Uptake of nicotinic acid and nicotinamide by rat erythrocytes. *J Biol Chem* 243:3388-94.
 67. Bozdech Z, Ginsburg H (2005) Data mining of the transcriptome of *Plasmodium falciparum*: the pentose phosphate pathway and ancillary processes. *Malar J* 4:17.
 68. Plowe CV (2014) Malaria: Resistance nailed. *Nature* 505:30-1.
 69. Arieu F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC *et al.* (2014) A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 505:50-5.
 70. Sørensen HP, Mortensen KK (2005) Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 4:1.
 71. Cosloy SD, Oishi M (1973) The nature of the transformation process in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* 124:1-10.
 72. Mülhard C (2013) Der Experimentator – Molekularbiologie/Genomics. 7te Auflage. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
 73. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51:263-73.
 74. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4.
 75. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH (1993) High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermusaquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl* 2:275-87.
 76. Cline J, Braman JC, Hogrefe HH (1996) PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 24:3546-51.
 77. Breslauer KJ, Frank R, Bröcker H, Marky LA (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3746-50.
 78. Sugimoto N, Nakano S, Yoneyama M, Honda K (1996) Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes. *Nucleic Acids Res* 24:4501-5.
 79. Xia T, SantaLucia J Jr, Burkard ME, Kierzek R, Schroeder SJ, Jiao X, Cox C, Turner DH (1998) Thermodynamic parameters for an expanded nearest-neighbor model for formation of RNA duplexes with Watson-Crick base pairs. *Biochemistry* 37:14719-35.
 80. Nakano S, Fujimoto M, Hara H, Sugimoto N (1999) Nucleic acid duplex stability: influence of base composition on cation effects. *Nucleic Acids Res* 27:2957-65.
 81. Larkin Ma, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-8.
 82. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25:1189-91.
 83. Kirsch RD, Joly E (1998) An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes. *Nucleic Acids Res* 26:1848-50.
 84. Gentz R, Bujard H (1985) Promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase selected by function: highly efficient promoters from bacteriophage T5. *J Bacteriol* 164:70-7.
 85. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.

86. Renart J, Reiser J, Stark GR (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:3116-20.
87. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4.
88. Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112(2):195-203.
89. Pingoud A, Urbanke C (1997) Arbeitsmethoden der Biochemie. 1te Auflage. Walter de Gruyter, Berlin.
90. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
91. Compton SJ, Jones CG (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151:369-74.
92. Cogan EB, Birrell GB, Griffith OH (1998) A robotics-based automated assay for inorganic and organic phosphates. *Anal Biochem* 271:29-35.
93. Gawronski JD, Besnon DR (2004) Microtiter assay for glutamine synthetase biosynthetic activity using inorganic phosphate detection. *Anal Biochem* 327:114-8.
94. D'Arcy A, Villard F, Marsch M (2007) An automated microseeding matrix-screening method for protein crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63:550-4.
95. Khurshid S, Haire LF, Chayen NE (2010) Automated seeding for the optimization of crystal quality. *J Appl Crystallogr* 43:752-756.
96. Ireton GC, Stoddard BL (2003) Microseed matrix screening to improve crystals of yeast cytosine deaminase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:601-5.
97. Stewart PDS, Kolek SA, Briggs RA, Chayen NE, Baldock PFM (2011) Random microseeding: A theoretical and practical exploration of seed stability and seeding techniques for successful protein crystallization. *Cryst. Growth Des* 11:3432–41.
98. Kallio JM, Hakulinen N, Kallio JP, Niemi MH, Kärkkäinen S, Rouvinen J (2009) The contribution of polystyrene nanospheres towards the crystallization of proteins. *PLoS One* 4:e4198.
99. Wiener MC (2004) A pedestrian guide to membrane protein crystallization. *Methods* 34:364-72.
100. Michel H (1983) Crystallization of membrane proteins. *Trends Biochem Sci* 8:56–9.
101. Sousa R (1995) Use of glycerol, polyols and other protein structure stabilizing agents in protein crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 51:271-7.
102. Koshland DE (1958) Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 44:98-104.
103. Anderson BF, Baker HM, Norris GE, Rumball SV, Baker EN (1990) Apolactoferrin structure demonstrates ligand-induced conformational change in transferrins. *Nature* 344:784-7.
104. Berfors TM (Editor) (2009) Protein crystallization. 2te Auflage. International University Line, La Jolla.
105. Schneider TR (2008) Synchrotron radiation: micrometer-sized x-ray beams as fine tools for macromolecular crystallography. *HFSP J* 2:302-6.
106. Rhodes G (2006) Crystallography made crystal clear. 3te Auflage. Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo.

107. Kabsch W (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl Cryst.* 26:795-800.
108. Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:125-32.
109. Kabsch W (2010) Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:133-44. doi: 10.1107/S0907444909047374.
110. Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 31:3381-5.
111. Han S, Forman MD, Loulakis P, Rosner MH, Xie Z, Wang H, Danley DE, Yuan W, Schafer J, Xu Z (2006) Crystal structure of nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase from *Staphylococcus aureus*: structural basis for NaAD interaction in functional dimer. *J Mol Biol* 360:814-25.
112. Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW *et al.* (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:213-21.
113. Brunger AT (2007) Version 1.2 of the crystallography and NMR system. *Nat Protoc* 2:2728-33.
114. Jones TA, Zou JY, Cowan SW, Kjeldgaard M (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A* 47:110-9.
115. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:486-501.
116. Becker K, Kanzok SM, Iozef R, Fischer M, Schirmer RH, Rahlfs S. (2003) Plasmoredoxin, a novel redox-active protein unique for malarial parasites. *Eur J Biochem* 270:1057-64.
117. Brandstädter C (2012) Heterologe Überexpression, Reinigung und biochemische Charakterisierung der Nicotinsäure-Mononukleotid Adenylyltransferase aus *Plasmodium falciparum*. Justus-Liebig-Universität Gießen.
118. Golovanov AP, Hautbergue GM, Wilson SA, Lian LY (2004) A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *J Am Chem Soc.* 126:8933-9.
119. Lu S, Smith CD, Yang Z, Pruett PS, Nagy L, McCombs D, Delucas LJ, Brouillette WJ, Brouillette CG (2008) Structure of nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase from *Bacillus anthracis*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 64:893-8.
120. Han S, Forman MD, Loulakis P, Rosner MH, Xie Z, Wang H, Danley DE, Yuan W, Schafer J, Xu Z (2006) Crystal structure of nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase from *Staphylococcus aureus*: structural basis for NaAD interaction in functional dimer. *J Mol Biol* 360:814-25.
121. Zhu DY, Zhu YQ, Xiang Y, Wang DC. (1983) Optimizing protein crystal growth through dynamic seeding. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61:772-5.
122. Saridakis E, Chayen NE. (2009) Towards a 'universal' nucleant for protein crystallization. *Trends Biotechnol* 27:99-106.
123. Sershon VC, Santarsiero BD, Mesecar AD (2008) Kinetic and X-Ray structure evidence for negative cooperativity in substrate binding to nicotinate mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) from *Bacillus anthracis*. *J Mol Biol* 385:867-88.
124. Sorci L, Pan Y, Eyobo Y, Rodionova I, Huang N, Kurnasov O, Zhong S, MacKerell AD, Zhang H, Osterman AL (2009) Targeting NAD biosynthesis in bacterial pathogens: Structure-based development of inhibitors of nicotinate mononucleotide adenylyltransferase NadD. *Chem Biol* 16:849-61.
125. Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, Block JN, Kapral GJ, Wang X, Murray LW, Arendall WB 3rd, Snoeyink J, Richardson JS, Richardson DC (2007) MolProbity: all-atom contacts

- and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue):W375-83.
126. Lovell SC, Davis IW, Arendall WB 3rd, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, Richardson JS, Richardson DC (2003) Structure validation by C α geometry: ϕ , ψ and C β deviation. *Proteins* 50:437-50.
 127. Zhang W, Kunker AK, Zhou Y (2007) Assessing secondary structure assignment of protein structures by using pairwise sequence-alignment benchmarks. *Proteins* 71:61-7.
 128. Joosten RP, te Beek TAH, Krieger E, Hekkelman ML, Hooft RWW, Schneider R, Sander C, Vriend G (2011) A series of PDB related databases for everyday needs. *Nucleic Acids Res* 39(Database issue):D411-9.
 129. Kabsch W, Sander C (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22:2577-637.
 130. Rossmann MG, Moras D, Olsen KW (1974) Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature* 250:194-9.
 131. Sershon VC, Santarsiero BD, Mesecar AD (2008) Kinetic and X-Ray structure evidence for negative cooperativity in substrate binding to nicotinate mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) from *Bacillus anthracis*. *J Mol Biol* 385:867-88.
 132. Zhang H, Zhou T, Kurnasov O, Cheek S, Grishin NV, Osterman A (2002) Crystal structures of *E. coli* nicotinate mononucleotide adenylyltransferase and its complex with deamido-NAD. *Structure* 10:69-79.
 133. Olland AM, Underwood KW, Czerwinski RM, Lo MC, Aulabaugh A, Bard J, Stahl ML, Somers WS, Sullivan FX, Chopra R (2002) Structure of *Bacillus subtilis* nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 64:893-8.
 134. Yoon HJ, Kim HL, Mikami B, Suh SW (2005) Crystal structure of nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa* in its Apo and substrate-complexed forms reveals a fully open conformation. *J Mol Biol* 351:258-65.
 135. Zhou T, Kurnasov O, Tomchick DR, Binns DD, Grishin NV, Marquez VE, Osterman AL, Zhang H (2002) Structure of human nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase. Basis for the dual substrate specificity and activation of the oncolytic agent tiazofurin. *J Biol Chem* 277:13148-54.
 136. Garavaglia S, D'Angelo I, Emanuelli M, Carnevali F, Pierella F, Magni G, Rizzi M (2002) Structure of human NMN adenylyltransferase. A key nuclear enzyme for NAD homeostasis. *J Biol Chem* 277:8524-30.
 137. Zhang X, Kurnasov OV, Karthikeyan S, Grishin NV, Osterman AL, Zhang H (2003) Structural characterization of a human cytosolic NMN/NaMN adenylyltransferase and implication in human NAD biosynthesis. *J Biol Chem* 278:13503-11.
 138. Gregoret LM, Rader SD, Letterick RJ, Cohen FE (1991) Hydrogen bonds involving sulfur atoms in proteins. *Proteins* 9:99-107.
 139. Zhou P, Tian F, Lv F, Zhang Z (2008) Geometric characteristics of hydrogen bonds involving sulfur atoms in proteins. *Proteins* 76:151-63.
 140. Saridakis V, Christendat D, Kimber MS, Dharamsi A, Edwards AM, Pai EF (2001) Insights into ligand binding and catalysis of a central step in NAD synthesis: Structures of *Methanobacterium thermoautotrophicum* NMN adenylyltransferase complexes. *J Biol Chem* 276:7225-32.
 141. Huang N, Sorci L, Zhang X, Brautigam CA, Li X, Raffaelli N, Magni G, Grishin NV, Osterman AL, Zhang H (2008) Bifunctional NMN adenylyltransferase/ADP-ribose pyrophosphatase: structure and function in bacterial NAD metabolism. *Structure* 16:196-

- 209.
142. Lasch P, Petras T, Ullrich O, Backmann J, Naumann D, Grune T (2001) Hydrogen peroxide-induced structural alterations of RNase A. *J Biol Chem* 276:9492-502.
143. Jayaram HN, Cooney DA, Grusch M, Krupitza G. (1999) Consequences of IMP dehydrogenase inhibition, and its relationship to cancer and apoptosis. *Curr Med Chem* 6:561-74.
144. Akoachere M, Buchholz K, Fischer E, Burhenne J, Haefeli WE, Schirmer RH, Becker K (2005) *In vitro* assessment of methylene blue on chloroquine-sensitive and -resistant *Plasmodium falciparum* strains reveals synergistic action with artemisinins. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4592-7.
145. Medicines for Malaria Venture. <http://www.mmv.org/> (Stand: Oktober 2014).
146. Nickel C, Trujillo M, Rahlfs S, Deponte M, Radi R, Becker K (2005) *Plasmodium falciparum* 2-Cys peroxiredoxin reacts with plasmoredoxin and peroxynitrite. *Biol Chem* 386:1129-36.
147. Buchholz K, Rahlfs S, Schirmer RH, Becker K, Matuschewski K (2008) Depletion of *Plasmodium berghei* plasmoredoxin reveals a non-essential role for life cycle progression of the malaria parasite. *PLoS One* 3:e2474.
148. Sarma GN, Savvides SN, Becker K, Schirmer M, Schirmer RH, Karplus PA (2003) Glutathione reductase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: crystal structure and inhibitor development. *J Mol Biol* 328:893-907.
149. Chayen NE, Saridakis E (2008) Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nat Methods* 5:147-53.
150. Benvenuti M, Mangani S (2007) Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for X-ray crystallography. *Nat Protoc* 2:1633-51.
151. Rupp B (2009) Biomolecular crystallography: Principles, practice, and application to structural biology. 1te Auflage. *Garland Science*, New York, Abingdon.
152. Kornberg A (2000) Ten Commandments: Lessons from the Enzymology of DNA Replication. *J Bacteriol* 182:3613-8.
153. Abergel C (2013) Molecular replacement: tricks and treats. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 69:2167-73.
154. D'Angelo I, Raffaelli N, Dabusti V, Lorenzi T, Magni G, Rizzi M (2000) Structure of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase: a key enzyme in NAD biosynthesis. *Structure* 8:993-1004.
155. Begley TP, Kinsland C, Mehl RA, Osterman A, Dorrestein P (2001) The biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotides in bacteria. *Vitam Horm* 61:103-19.
156. Mehl RA, Kinsland C, Begley TP (2000) The biosynthesis of nicotinamideadenine dinucleotides in bacteria. *J Bacteriol* 182:4372-4.
157. Lau C, Niere M, Ziegler M (2009) The NMN/NaMN adenylyltransferase (NMNAT) protein family. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:410-31.
158. Dahmen W, Webb B, Preiss J (1967) The deamido-diphosphopyridine nucleotide and diphosphopyridine nucleotide pyrophosphorylases of *Escherichia coli* and yeast. *Arch Biochem Biophys* 120:440-50.
159. Bill RM, Henderson PJ, Iwata S, Kunji ER, Michel H, Neutze R, Newstead S, Poolman B, Tate CG, Vogel H (2011) Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nat Biotechnol* 29:335-40.
160. Semenova NP, Abarca-Heidemann K, Loranc E, Rothberg BS (2009) Bimane fluorescence scanning suggests secondary structure near the S3-S4 linker of BK channels. *J Biol Chem* 284:10684-93.

161. Smirnova I, Kasho V, Kaback HR (2014) Real-time conformational changes in LacY. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:8440-5.
162. Islas LD, Zagotta WN (2006) Short-range molecular rearrangements in ion channels detected by tryptophan quenching of bimane fluorescence. *J Gen Physiol* 128:337-46.
163. Mansoor SE, McHaourab HS, Farrens DL (2002) Mapping proximity within proteins using fluorescence spectroscopy. A study of T4 lysozyme showing that tryptophan residues quench bimane fluorescence. *Biochemistry* 41:2475-84.
164. Kosower NS, Kosower EM, Newton GL, Ranney HM (1979) Bimane fluorescent labels: labeling of normal human red cells under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:3382-6.
165. Klomsiri C, Karplus PA, Poole LB (2011) Cysteine-based redox switches in enzymes. *Antioxid Redox Signal* 14:1065-77.
166. Marino SM, Gladyshev VN (2011) Analysis and functional prediction of reactive cysteine residues. *J Biol Chem* 287:4419-25.
167. Miki H, Funato Y (2012) Regulation of intracellular signalling through cysteine oxidation by reactive oxygen species. *J Biochem* 151:255-61.
168. Gould N, Doulias PT, Tenopoulou M, Raju K, Ischiropoulos H. (2013) Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation. *J Biol Chem* 288:26473-9.
169. Grek CL, Zhang J, Manevich Y, Townsend DM, Tew KD (2013) Causes and consequences of cysteine S-glutathionylation. *J Biol Chem* 288:26497-504.
170. Traut TW (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* 140:1-22.
171. Beis I, Newsholme EA (1975) The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 152:23-32.
172. Huang H, Zhang X, Li S, Liu N, Lian W *et al.* (2010) Physiological levels of ATP negatively regulate proteasome function. *Cell Res* 20:1372-85.
173. Imsande J (1961) Pathway of diphosphopyridine nucleotide biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 236:1494-7.
174. Emanuelli M, Amici A, Carnevali F, Pierella F, Raffaelli N, Magni G (2003) Identification and characterization of a second NMN adenylyltransferase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* 27:357-64.
175. Cheek S, Zhang H, Grishin NV (2002) Sequence and structure classification of kinases. *J Mol Biol* 320:855-81.

Danksagungen

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Katja Becker für die Möglichkeit bedanken meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen und dass sie an den erfolgreichen Abschluss geglaubt hat, auch wenn die Ergebnisse lange auf sich haben warten lassen.

Prof. Dr. Peter Friedhoff danke ich für die Übernahme des Korreferats. In diesem Zusammenhang möchte ich auch den beiden verbliebenen Prüfungsmitgliedern Prof. Dr. Tina Trenczek und Prof. Dr. Lienhard Schmitz danken.

Dr. Stefan Rahlfs danke ich für die initiale Idee den NAD-Stoffwechsel von *Plasmodium* näher zu untersuchen und vorausgehende gemeinsame Klonierungen mit Dr. Rimma Iozef.

Ohne die fortwährende Unterstützung und Geduld einer Vielzahl von Personen während der Laborarbeit hätte diese Arbeit nicht entstehen können. So wäre die Struktur der PfNaMNAT wohl niemals ohne die Hilfe von Dr. Karin Fritz-Wolf fertig geworden. Ihr danke ich in besonderem Maße für die zahlreichen Erläuterungen zur Kristallographie und Strukturbiologie und das vermittelte Wissen. Marina Fischer gilt mein Dank für die Unterstützung bei einer Vielzahl von Assays sowie dem *screening* der Malaria Box. Siegrid Franke danke ich für den Wirksamkeitstest von Tiazofurin innerhalb der Zellkultur. Dr. Didier Belorgey danke ich für seine Bemühungen den ursprünglichen NaPRT-Assay zu reproduzieren. Dr. Ilme Schlichting und Dr. Anton Meinhart danke ich für das Aufnehmen der Beugungsdaten am Synchrotron. Eine große Unterstützung waren auch Michaela, Melissa und Sina, wenn mal bei verschiedensten Dingen eine helfende Hand nötig war.

Mein größter Dank gilt Esther, die mir nicht nur mit ihrer fachlichen Kompetenz bei zahlreichen Fragen weitergeholfen hat, sondern mir auch eine große persönliche Stütze und ein sehr guter Freund war.

In diesem Zusammenhang danke ich auch meinen anderen Freunden Christina, Jette und Marina innerhalb des Instituts, ohne die die Arbeit sehr langweilig gewesen wäre. Zudem haben sie einen Großteil der Arbeit korrekturgelesen.

Meinem „Chef“ Gregor danke ich, dass er mir auch heute noch immer gerne einen guten Rat gibt.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich beständig unterstützt haben.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in dieser Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Datum

Unterschrift